

İNTERFERON REGÜLATÖR FAKTÖR 3 (IRF3) GENİNİN GENETİK ANALİZİ

GENETIC ANALYSIS OF INTERFERON REGULATOR FACTOR 3 (IRF3) GENE

SOLMAZ MOSAYYEBİ

PROF. DR. REYHAN ÖNER
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

SOLMAZ MOSAYYEBİ'in hazırladığı “**İnterferon Regülatör Faktör 3 (IRF3) Geninin Genetik Analizi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından B YOLOJ  ANABÖLÜM DALI'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ
Başkan

Prof. Dr. Reyhan ÖNER
Danışman

Prof. Dr. Can Omer KALAYCI
 ye

Prof. Dr. Hatice MERGEN
 ye

Yrd. Dr. Mert S ZEN
 ye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma Sevin Düz
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Dođduđumdan bu yana elimi hiç bırakmayan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen

Süper Babam, Jahangir MOSAYYEBİ

ve

Canım Annem Shahnaz HASHEMİ'ye

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

02/01/2014

SOLMAZ MOSAYYEBİ

ÖZET

İNTERFERON REGÜLATÖR FAKTÖR 3 (IRF3) GENİNİN GENETİK ANALİZİ

SOLMAZ MOSAYYEBİ

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Reyhan ÖNER

Ocak 2014, 63 sayfa

İnterferon Düzenleyici Faktör 3 (IRF3) proteini IRF (Interferon Regulating Factor: IRF) ailesinin bir üyesidir. Birçok IRF, patojenlere karşı cevap oluşumunda, hematopoietik hücrelerin farklılaşmasında, gen ifadesinin düzenlenmesinde, hücre döngüsü ve apoptozisin düzenlenmesinde rol oynar. İnterferon düzenleyici faktör 3 (IRF3), bir transkripsiyon faktörüdür. IRF3 birçok hücrede, sitoplazma içerisinde inaktif formda bulunur. Virüs enfeksiyonu ardından aktif hale gelir; yer değiştirerek hücre çekirdeğine hareket eder ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır.

Bu çalışmada IRF3 genindeki genetik değişikliklerin Türk toplumundaki frekansını ve astım ile olan ilişkisinin ortaya konması hedeflenmiştir.

Astım, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı geri dönüşümlü hava yolu daralması, bronş aşırı duyarlılığı ve hava yolu inflamasyonu ile karakterize olan, mekanizması tamamiyle aydınlatılmamış kompleks bir hastalıktır.

Sunulan bu çalışmada ilk olarak IRF3 molekülünün 25 sağlıklı ve 25 astımlı bireyde yakın ve uzak promotor bölgesini içine alacak şekilde 1000 baza kadar promotor, 5' UTR, 8 ekzonun tümü, ekzon intron bağlantı bölgeleri ve 3'UTR bölgeleri DNA dizi analiz yöntemi ile gendeki nükleotit değişikliği tarandı. Yapılan

bu tarama sonucunda, IRF3 genindeki SNPlerin 7 adedi Türk toplumunda saptandı ve hasta, kontrol bireylerin genotip ve alel frekansları belirlendi. İkinci aşamada rs34739574 ve rs139412285 SNP'lerinin astımlı ve kontrol örnek sayısı artırılarak PZR-RFLP yöntemi ile Türk toplumunda görülme sıklıkları belirlendi.

Sonuç olarak tanımlanan rs3204440 SNPnin sıklığı astımlı ve sağlıklı bireyler arasında genotip ve alel frekansları dağılımı açısından anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$). Ancak tanımlanan diğer SNP lerin sıklığı astımlı ve sağlıklı bireyler arasında genotip ve alel frekansları dağılımı açısından farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Anahtar Kelimeler: İnterferon, interferon regülatör faktör 3, astım, tek nükleotit polimorfizmi, endotoksin sinyal yolu

ABSTRACT

GENETIC ANALYSIS OF INTERFERON REGULATOR FACTOR 3 (IRF3) GENE

SOLMAZ MOSAYYEBİ

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Reyhan ÖNER

January 2014, 63 pages

Interferon Regulating Factor 3 (IRF3) protein is a member of IRF (Interferon Regulating Factors) family. Most of IRFs play an important role in the constitution of responses to pathogens, differentiation hematopoietic cells, regulation of gene expression, the regulation of the cell cycle and apoptosis. Interferon regulatory factor 3 (IRF3) is a transcription factor. IRF3 is located in the cytoplasm as an inactive form in many cells. Upon virus infection, IRF3 is activated and is translocated to the nucleus, where it induces the transcription of target genes.

The purpose of this search is to show the association between frequency of genetic variation of IRF3 gene with asthma in Turkish population.

Asthma is a complex disease, whose mechanism has not been completely displayed, which is characterized by reversible airway contraction, extreme bronchial sensitivity, and airway inflammation. In the development of asthma, genetic and environmental factors are the most prominent effective risk factors.

In this study, firstly in 25 healthy people and 25 asthma patients the promotor up to 1000 base pairs, the 5' UTR, all 8 exons, with the exon-intron boundaries and

3'UTR regions of IRF3 molecule screened with DNA sequence analysis method in a manner including the near and distant promotor region.

As a result of DNA sequence analysis in Turkish population, 7 SNPs of IRF3 molecule were detected and genotype, allele frequency of patient and control groups are determined. Secondly, the prevalence of known 2 SNPs (rs34739574 and rs139412285) with increasing the number of samples in Turkish population were determined by the PCR-RFLP method.

Consequently, in our study the rs3204440 SNP showed significant genotype/allele associations with Asthma ($p < 0.05$). But in other detected SNPs in IRF3 gene is no significantly different between of two groups (Asthma and Controls) ($p > 0.05$).

Keywords: Interferon, interferon regulating factor 3, asthma, single nucleotide polymorphisms, endotoxin signal pathway

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi ve önerileri ile yardımcı olan, sevgi ve ilgisini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Reyhan ÖNER'e,

Tez aşamalarında bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan, yol gösteren çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'e ve Sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e ve proje öneri sahibi Sayın Prof. Dr. Ömer KALAYCI'ya,

Projenin hazırlanması ve tez çalışmalarında yardımcı olan Dr. Çağatay KARAASLAN'a, ayrıca DNA örneklerinin temin edilmesini sağlayan Hacettepe Üniversitesi Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi tüm çalışanlarına,

İstatistiksel hesaplamaların yapılmasında yardımcı olan Tıp Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi Doç. Dr. Ümit. M. ŞAHİNER'e,

Doktora eğitimine başladığım bu yana akademik hayata beni teşvik eden ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma,

Bana her konuda yardımcı olan Arş. Gör. Demet ERDÖNMEZ'e, Hamideh HAMAMCHI'ye

Tez çalışmam süresince, her ihtiyacım olduğunda gerek bilgi gerek destekleriyle yanımda olan değerli dostlarım, Nazila FARHANGZAD'a, Arş. Gör. Neslihan İDİL'e, Arş. Gör. Gözde KOŞARSOY'a, Arş. Gör. Hayriye AKEL'e, ve Neşe VARDAR'a

Uzaktan sevgi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok ince kalpli kardeşlerime Sanaz ve Morteza MOSAYYEBİ'ye

Her şeyden önemlisi, çalışmalarım süresince büyük bir özveri ile beni destekleyen ve her zaman yanımda olan çok sevgili, İsmail KILINÇER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Solmaz MOSAYYEBİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnterferon	4
2.2. İnterferonların Tipleri	4
2.2.1. Tip I İnterferonlar	4
2.2.2. Tip II İnterferonlar	4
2.2.3. Tip III İnterferonlar	5
2.3. Viral Enfeksiyonlar ve İnterferonların Aktivasyonu	5
2.4. İnterferon Düzenleyici Faktörler [İnterferon Regulating Factor (IRF)]	5
2.4.1. İnterferon Düzenleyici Faktör 3 [İnterferon Regulating Factor 3 (IRF3)]	7
2.4.2. IRF3'ün Genomik Organizasyonunun Karakterizasyonu	9
2.4.3. İnterferon Regülatör Faktör 3 ve Hastalıklar	15
2.5. Astım	16
2.5.1. Astım Epidemiyolojisi	17
2.5.2. Astımda Risk Faktörleri	18
2.5.3. Astım ve Enfeksiyonlar	19
2.5.4. Astım ve İnflamatuar Hücreler	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması	23
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	23
3.2.1. IRF3 Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması	24
3.3. Otomatik DNA Dizi Analizi	28
3.3.1. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	28
3.3.2. Otomatik DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi)	29

3.4. IRF3 Genotiplenme Metodu	30
3.4.1. PZR-RFLP [Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)].....	30
3.4.2. RFLP İçin Örneklerin Hazırlanması	31
4. SONUÇLAR	33
4.1. IRF3 Geni PZR Sonuçları	33
4.2. Otomatik DNA Dizi Analizi	33
4.3. IRF3 1. İntron ve 5'UTR Bölgelerinde Yer Alan rs34739574 ve rs139412285 Polimorfizimlerinin Genotiplenme Sonuçları	46
4.3.1. IRF3 rs34739574 Polimorfik Bölgesinin <i>Dde</i> / Enzimi Kesim Sonuçları	48
4.3.2. IRF3 rs139412285 Polimorfik Bölgesinin <i>Bfa</i> / Enzimi Kesim Sonuçları.....	48
5. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	56
EK 1. ETİK KURULU ONAYI	61
ÖZGEÇMİŞ	62

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Türkiye’de çocuk ve erişkinlerde yapılan bölgesel prevalans çalışmaları ve risk faktörleri	18
Çizelge 2.2. Astım hastalığı ile ilişkili bazı genler ve kromozom üzerinde yerleri.....	19
Çizelge 2.3. Astımın gelişmesinde rol oynadığı düşünülen aday genlere örnekler	19
Çizelge 3.1. PZR reaksiyon karışımı	24
Çizelge 3.2. IRF3 geni ile ilgili gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin dizisi	25
Çizelge 3.3. IRF3 geni ile ilgili gen bölgelerinin PZR koşulları ve PZR ürün büyüklükleri	26
Çizelge 4.1. IRF3 genin promotor (uzak ve yakın), 8 ekzon ‘nu (1, 2, 3_4, 5_6, 7, 8) ve 3’UTR bölgelerinde bulunan polimorfizmler	34
Çizelge 4.2. IRF3 geninde bulunan (rs2304204, rs2304206, rs2304205, rs320440, rs34739574, rs139412285, rs139412285 ve rs7251 polimorfizmlerin oluşturduğu genotip ve alel frekanslarının kontrol ve hasta grubunda dağılımı	44
Çizelge 4.3. 25 Astımlı bireyde IRF3 geninin genotipleme sonuçları.....	45
Çizelge 4.4. 25 Kontrol bireyde IRF3 geninin genotipleme sonuçları	45
Çizelge 4.5 Sağlıklı ve astımlı bireylerde IRF3 rs34739574 polimorfizminde genotip dağılımı.....	48
Çizelge 4.6. Astımlı ve sağlıklılarda IRF3 rs34739574 polimorfizme ait alel dağılımı.....	48
Çizelge 4.7 Sağlıklı ve astımlı bireylerde IRF3 rs139412285 polimorfizminde genotip dağılımı.....	48
Çizelge 4.8. Sağlıklı ve astımlı bireylerde IRF3 rs139412285 polimorfizminde genotip dağılımı	48

Çizelge 4.9. Sağlıklı ve astımlı çocukların özellikleri	49
---	----

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. IRF3, IRF5 ve IRF7'nin dizi benzerliği	7
Şekil 2.2. JAK/STAT yolu	8
Şekil 2.3. A) IRF3 genine ait promotor, 5'UTR, B) 1. ekzon, intronun organizasyonu ve C) kromozom üzerinde yeri	10
Şekil 2.4. IRF3 geninin promotor, 5'UTR, ekzon, intron ve 3'UTR bölgelerinin DNA dizilimi şekil üzerinde gösterilmiştir. Kırmızı ile betimlenmiş kısımlar ekzon bölgelerini göstermektedir. Translasyonun başlama kodonu mavi ile belirtmiştir.....	12
Şekil 2.5. IRF3 geni cDNA ve aminoasit şifreleyen bölgelerinin dizilimi.....	13
Şekil 2.6. IRF-3 genine ait promotor, 5'UTR (untranslated region), 1. ekzon ve intronun nükleotit dizisi	15
Şekil 2.7. Endotoksin sinyal yolu	21
Şekil 3.1. IRF3 gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi (Primerler sarı renk ile gölgelendirilmiştir.).....	27
Şekil 3.2. IRF3 geninin rs34739574 genotiplenmesinde kullanılan primerler ve Dde I enziminin tanıma gölgesi.....	31
Şekil 3.3. IRF3 geninin rs139412285 genotiplenmesinde kullanılan primerler ve Bfa I restriksiyon endonükleaz enziminin tanıma gölgesi.....	31
Şekil 4.1. IRF3 genin promotor (uzak ve yakın), 8 ekzon ve 3'UTR bölgelerin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi (1. uzak promotor, 2. yakın promotor, 3. Ekzon 1, 4. Ekzon 2, 5. Ekzon 3 ve 4, 6. Ekzon 5 ve 6, 7. Ekzon 7, 8. Ekzon 8 ve 9. 3'UTR)	33
Şekil 4.2. IRF3 geni 5'UTR bölgesinde bulunan polimorfizm rs2304204	35
Şekil 4.3. IRF3 geni 5'UTR bölgesinde bulunan polimorfizm rs3204440	36
Şekil 4.4. IRF3 geni 5'UTR bölgesinde bulunan polimorfizm rs2304205	37
Şekil 4.5. IRF3 geni 5'UTR bölgesinde bulunan polimorfizm rs139412285	38
Şekil 4.6. IRF3 geni 1. intron bölgesinde bulunan polimorfizm rs2304206	39

Şekil 4.7. IRF3 geni 1. intron bölgesinde bulunan polimorfizm rs34739574	40
Şekil 4.8. IRF3 geni Ekzon 8 bölgesinde bulunan polimorfizm rs7251	41
Şekil 4.9. IRF34 geni sekans dizi üzerinde amplikasyon primerleri, Dde I kesim noktası ve rs34739574 nükleotit değişiklik noktası belirtilmiştir. Restriksiyon endonükleaz ile kesim sonucunda oluşan görüntü agaroz jel elektroforezi resminde gösterilmektedir.	46
Şekil 4.10. IRF3 geni sekans dizi üzerinde amplikasyon primerleri, Bfa I kesim noktası ve rs139412285 nükleotit değişiklik noktası belirtilmiştir. Restriksiyon endonükleaz ile kesim sonucunda oluşan görüntü agaroz jel elektroforezi resminde gösterilmektedir.	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
λ	Lamda
μ	Mikro

Kısaltmalar

Ap1	Aktive edici protein1
bç	Baz çifti
CTD	C-terminal transactivation domain
DBD	DNA-bağlayıcı domain
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribo Nükleozit Trifosfat
ds RNA	çift zincirli RNA
ECRHS	Avrupa Topluluğu solunum yolları sağlığı araştırması
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
HBV	Hepatit B virüs
HCV	Hepatit C virüs
HOX	Home box
IAD	IRF bağlantı domain
IFN	İnterferon
IFN- α	İnterferon alfa
IFN- β	İnterferon beta
IFN- γ	İnterferon gama
IFN- λ	İnterferon lamda
IgE	İmmünoglobülin E
IL	İnterlökin
IL-10	İnterlökin 10

IL-12	İnterlökin 12
IL-1 β	İnterlökin 1 β
IL-4	İnterlökin 4
IRF	İnterferon regülatör faktör
IRF3	İnterferon regülatör faktör 3
ISAAC	Çocuk astım ve alerji için uluslararası çalışma
ISGF3	İnterferon stimulated transkripsiyon faktör
ISRE	IFN ile uyarılan düzenleyici element
kDa	kiloDalton
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojen-aktive protein kinaz
MDA-5	Melanoma farklılaşma ilişkili gen 5
MHC 1	Majör histokompatibilite kompleks
ml	Mililitre
mM	Milimolar
μ l	Mikrolitre
NaCl	Sodyum klorür
NES	Çekirdek export sinyal
NK	Doğal öldürücü hücre
P	İstatistiksel anlamlılık değeri
PBMC	Peripheral kan mononükleer hücreler
PRR	Patojen tanıma reseptörleri
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi)
RIG-I	Retinoik asit indüklenebilir gen I
SLE	Sistemik lupus eritematozus
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
Sp1	Spesifite protein 1
SRF	Serum cevap faktörü
STAT	Sinyal iletilici ve transkripsiyon uyarıcı yol
TAD	Trans aktivasyon domain
Th	Yardımcı T hücreleri
TLR	Toll-benzeri reseptörler

TNF	Tümör nekroz faktör
UTR	Translasyona uğramayan bölge
UV	Mor ötesi

1. GİRİŞ

Hızlı ve düzenlenmiş hücre tepkisi, konak savunmasının merkezinde yer almaktadır. Belirli bir transkripsiyon faktörünün hücre tipi ve/veya hücresel uyarıcıların yapısına bağlı olarak bu hücresel cevap, farklı bir hedef gen setinin ifadesini kontrol ettiği bir genetik düzenleyici sistem tarafından koordine edilmektedir. Böyle bir transkripsiyon faktörünün işlevsel çeşitliliği, hücre içerisinde birlikte dağılan ve/veya aktive edilen transkripsiyon faktörleri ile modifikasyonuna (örneğin, fosforilasyon) ve/veya etkileşimine bağlıdır, aslında bu düzenleyici sistemler ile ilgili genlerin dağılımını hızlı bir şekilde değiştirdiklerinden hücre dışı patojenlere karşı, konak savunması açısından kritiktir [1].

Antiviral cevapta öncelikle patojenler hücrelerin özgül reseptörleri aracılığıyla tanınır daha sonra bu patojenlere karşı interferonlar üretilir. Moleküler olarak karakterize edilen ilk sitokin serisi olan interferonların (IFN), viral enfeksiyona karşı konak savunmasında önemli görevleri vardır. İnterferonlar, interferon üreten hücrenin tipine ve interferon üretimini uyaran patojen tipine göre 3 grup altında toplanmıştır. Tip I interferonlar: Bu grupta IFN- α alt tipleri, IFN- β ve daha az bilinen IFN- ϵ , IFN- κ ve IFN- ω gibi aile üyeleri mevcuttur. Tip II interferonlar: Bu grupta yer alan interferon gamma (IFN- γ) mitojenik etki sonucunda veya antijenle uyarılmış yardımcı T hücrelerinden salınır. Tip III interferonlar: Bu grupta IFN- λ 1, IFN- λ 2 ve IFN- λ 3 aile üyeleri mevcuttur [2,3].

İnterferonların ifadesi İnterferon Regülatör Faktör proteinleri tarafından kontrol edilir. Bu güne kadar, interferon regülatör faktör (IRF) ailesinin dokuz üyesi (IRF-1 - IRF-9) tespit edilmiştir. Bu faktörlerin, ortak noktaları, iyi korunmuş bir N-terminal DNA-bağlayıcı (DBD) bölgedir ancak farklı fonksiyonel özellikler gösterirler ve immün yanıtı için gen ifadesini düzenleyen, hematopoez ve hücre yaşamı için kritik aktivatörler ve/veya baskılayıcılar olarak görev yaparlar [4].

IRF-3 proteini, İnterferon regülatör faktörler ailesinin bir üyesidir. IRF-3 proteini tüm hücrelerde ve dokularda ifade olur ve önemli bir hücresel antiviral sinyal molekülüdür. IRF-3'ün çeşitli hücresel yollarda yer aldığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar hücredeki fazla miktarda IRF-3 proteinin, DNA sentezini inhibe ederek apoptozda önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir [5]. IRF-3 proteinini kodlayan gen kromozom 19q13.3-q13.4'e yerleşmiştir ve 8 ekzonu bulunur. IRF-3 proteini

55 kDa molekül ağırlığındadır ve toplam 427 aminoasitten oluşur. IRF-3 proteinin 2 önemli domaini vardır: NTD (N-terminal DNA-binding domain) ve CTD (C-terminal transactivation domain). Enfeksiyona uğramamış hücrelerin sitoplazmasında IRF-3'ün 2 domaini birbiri ile etkileşime girerler ve aktif olmayan bir uyum oluşturur. Enfeksiyonun ardından, virüs ya da çift zincirli RNA enfeksiyonu sonrasında; IRF3, C-terminal domaininin fosforilasyonu ile aktif hale getirilir sonrasında yer değiştirerek hücre çekirdeğine hareket eder ve çekirdekde hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır [6-8].

Bu tez çalışmasında IRF3 geninin Türk popülasyonunda genetik analizinin yapılması hedeflenmiştir. Ayrıca IRF 3'ün pek çok hastalıkla ilişkisi olduğu için normal bireylerin yanı sıra özellikle astımlı hastalarda da genin analizi yapılmıştır.

Astım, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı geri dönüşümlü hava yolu daralması, bronş aşırı duyarlılığı ve hava yolu inflamasyonu ile karakterize, mekanizması tamamiyle aydınlatılmamış kompleks bir hastalıktır. Astım gelişiminde, kişisel (genetik, obezite, cinsiyet) ve çevresel faktörler (allerjenler, enfeksiyonlar, mesleki duyarlaştırıcılar, sigara, ev içi ve ev dışı hava kirliliği) etkileşime girerek hastalığın ortaya çıkmasına neden olur. Astım farklı yaş grubundaki tüm insanları etkileyen ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Tüm dünyada bu hastalıktan etkilenen 300 milyon kişinin olduğu rapor edilmiştir [9]. Birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de önemli sağlık problemlerinden olan astım, hem yaşam kalitesinin düşmesi hem de yüksek tedavi masrafları nedeniyle öncelik verilmesi gereken bir sorundur. Aile ve vaka- kontrol ilişkisi çalışmaları, astıma yatkınlıkla ilgili çok sayıda kromozomal bölgeyi tanımlamıştır. Birçok gen tarafından etkilenen bir hastalık olan astımın patogenezi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Astımla ilişkili yeni genlerin bulunması ve bu genlerin etkilerinin araştırılması hem astım patogenezinin anlaşılması hem de yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Önerilen çalışma, IRF-3 proteinin astımdaki fizyolojik yerini tanımlanması ile henüz anlaşılammış astım patogenezinin açıklanmasına katkıda bulunacaktır.

Bu tez çalışmasında öncelikle Türk popülasyonundaki IRF-3 proteinini şifreleyen gendeki olası varyantlar tanımlandı. IRF-3 genin promotörü, 8 eksonu, ekson-intron bağlantı bölgeleri ve 3' UTR bölgesi özgün primerlerle çoğaltılarak DNA dizi analizi yöntemi ile incelendi. Saptanan varyasyonlardan ikisi daha sonra uygun

PZR-RFLP yöntemi ile tanımlanarak alel ve genotip frekansları astımlı ve normal bireylerde karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnterferon

İnterferonlar (IFN) özgül hücreler tarafından patojenlere (bakteri, parazit ve tümör hücreleri) özellikle de virüslere karşı cevap olarak immün sistem hücreleri tarafından üretilir. İnterferonlar doğal proteinlerdir. Sitokinler olarak bilinen glikoprotein ailesinin içinde yer alırlar [2]. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, virüs enfeksiyonlarında interferonların enfeksiyonlara karşı aktif rol oynadıklarını göstermiştir [10]. Virüsle enfekte olan hücrelerden salınan interferonlar, enfekte olmamış hücrelerin reseptörlerine bağlanarak bu hücreleri uyarır ve virüse karşı direnç oluşumunu sağlar [2,3].

2.2. İnterferonların Tipleri

İnterferonlar, interferon üreten hücrenin tipine ve interferon üretimini uyaran patojen tipine göre 3 grup altında toplanmıştır.

2.2.1. Tip I İnterferonlar

Bu grupta IFN- α alt tipleri, IFN- β ve daha az bilinen IFN- ϵ , IFN- κ ve IFN- ω gibi aile üyeleri mevcuttur.

Tip I interferonlar viral enfeksiyonlara karşı erken doğal immüniteyi düzenlerler. Virüs ile enfekte olan hücreden salınan interferonlar enfekte olmamış komşu hücreleri uyararak bu hücreleri enfeksiyondan korurken aynı zamanda otokrin olarak enfekte olan hücredeki virüs replikasyonunu azaltır. Bunun yanı sıra tip I interferonlar sınıf 1 MHC (Major histocompatibility complex) moleküllerinin ifadesini artırır, Th1 hücrelerinin (T Helper Cells) gelişimini uyarır ve NK hücrelerinin (Natural Killer Cells) sitolitik aktivitesini artırır. Tüm tip I interferonlar, hedef hücrelerin yüzeyinde bulunan özgül reseptör komplekslerine bağlanarak etkilerini gösterirler.

IFN- α lökositlerden, IFN- β ise fibroblastlardan salgınır [2,3,9,10].

2.2.2. Tip II İnterferonlar

İnterferon gamma (IFN- γ) mitojenik etki sonucunda veya antijenle uyarılmış T helper hücrelerinden salgınır. En önemli makrofaj uyarıcı sitokindir. Aktif makrofajlar fagosite ettikleri mikropları öldürme yönünde uyarır. IFN- γ , IFNGR adlı reseptör kompleksine bağlanarak aktivite gösterir [2,3,10,11].

2.2.3. Tip III İnterferonlar

Bu grupta IFN- λ 1, IFN- λ 2 ve IFN- λ 3 aile üyeleri mevcuttur. Ayrıca, 28a, 28b ve 29a interlökinler olarak da adlandırılmaktadır. Tip III FN'nin biyolojik aktiviteleri IFN I aktivitelerine benzer, ama genellikle daha az yoğun ve daha kısıtlıdır [10,11].

2.3. Viral Enfeksiyonlar ve İnterferonların Aktivasyonu

Virüs ile enfekte olduğunda konakçı tarafından geliştirilen antiviral cevapta ilk önemli adım virüslerin hücreler tarafından tanınmasıdır. Patojen tanıma reseptörleri (Patogen recognition receptor PRR'ler) adı verilen reseptörler bu görevden sorumlu reseptör ailesidir [12].

PRR'lerin Tipleri:

1. **Toll-benzeri reseptörler (Toll-Like Receptors):** Viral nükleik asitleri tanıyan TLR'ler: TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 dir.
2. **Melanoma farklılaşma ilişkili gen 5 (Differentiation-Associated gene 5);** MDA-5
3. **Retinoik asit İndüklenebilir Gen I (Retinoic acid-Inducible Gene I);** RIG-I şeklinde sınıflandırılmıştır.

Antiviral cevaptaki ikinci adım Tip I IFN'lerin üretimidir. Tip I IFN'ler ilk olarak 1957'de Isaacs ve Lindermann tarafından yapılan çalışmada viral replikasyonda etkili olan proteinler olarak gösterilmiştir [13]. Tip I IFN'lerin salgılanması ile viral replikasyona karşı direnç uyarılması, MHC sınıf I ifadesi ve antijen sunumu artmaktadır. Aynı zamanda doğal katil hücreler olarak bilinen NK (Natural Killer Cell) hücrelerini aktive ederek virüs ile enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Buna ek olarak IFN'lar, tip I IFN reseptörlerine bağlanarak ISGF3'ü (Interferon Stimulated Transcription Factor, IFN ile uyarılan gen faktör 3) aktive eder ve IFN ile indüklenebilir genlerin transkripsiyonunu, pro-inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınımını indükler [13,14].

2.4. İnterferon Düzenleyici Faktörler [Interferon Regulating Factor (IRF)]

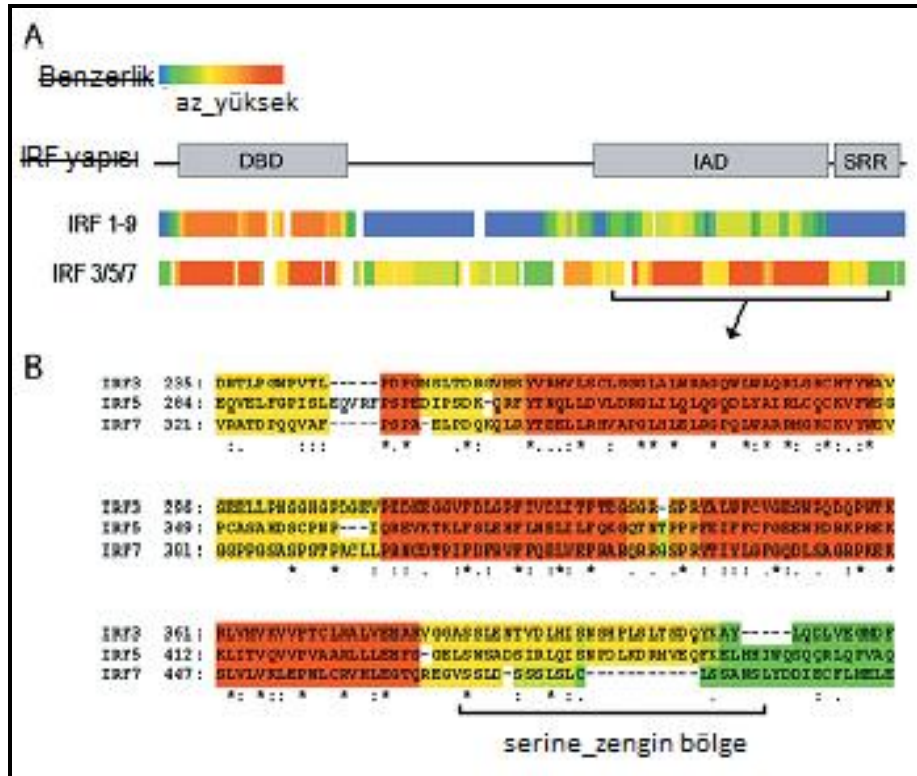
İnterferonların ifadesi İnterferon Regülatör Faktör (IRF) proteinleri tarafından kontrol edilir. Memelilerde 9 üyeden oluşan IRF ailesi, IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (ICSBP) ve IRF9 (ISGF3Y), 1980'lerin sonunda Tip I interferon araştırmaları sonucunda tespit edilmiştir. Birçok IRF, patojenlere karşı

cevap oluşumunda, hematopoietik hücrelerin farklılaşmasında, gen ifadesinin düzenlenmesinde, hücre döngüsü ve apoptozisin düzenlenmesinde rol oynar [15].

Bu ailenin proteinleri özgül bir DNA-bağlayıcı domaini (DBD) paylaşır. Bu domainde triptofan uçları DNA ile temasa geçtiğinde hidrofobik bir alan oluştuğu düşünülmektedir. Bu alan beş adet yüksek korunumlu triptofan tekrarlarıyla ilk 115 aminoaside karakterize edilip; yerleştirilmiştir. Triptofan reziduları sadece üçü DNA ile temas kurmak için gereklidir. Tüm IRF'ler arasında ortak olan bu domain Helix-turn-Helix yapısı oluşturarak, IFN tarafından uyarılan genlerin promotor bölgesinde yer alan IFN-ile uyarılan düzenleyici element (Interferon Stimulated Regulated Element ISRE) bölgesine bağlanmaktadır [16-18].

Bu faktörlerin her birinin DBD'si benzer bir temel DNA sekansını tanıyor olsa da bağlayıcı alan, tek başına özgül promotor elementlerini hedeflemede ve bu faktörlerden her birinin özgül fonksiyonunu yönlendirmede yeterli değildir. IRF moleküllerinin IRF bağlantı domaini (Interferon Associated Domain IAD) olarak da bilinen C-terminal bölgeleri DBD'ye göre daha az korunuyor olsa da, IRF faktörlerinin bazıları, IRF3, IRF5, IRF7 bu bölgede benzerlik göstermektedir [12,17,18] (Şekil 2.1). Bu bölgenin IRF'lerin protein-protein etkileşimlerini düzenlemede önemli olduğu düşünülmektedir. IRF proteinlerinin C-terminali (IRF1 ve IRF2 dışında) başka transkripsiyon faktörleri ile homo-heteromerik etkileşimlerden sorumludur. Diğer proteinlerle olan etkileşimler, muhtemelen IRF'lerin DNA bağlayıcı özgünlüğüne ve fonksiyonuna katkıda bulunur. Bu etkileşimler IRF'lerin çekirdeğe taşınmalarına da katkıda bulunur [12,15].

IRF'ler üzerine yapılan çalışmalar IRF'lerin özgün olarak Tip I IFN uyarılmasında önemli olduklarını göstermektedir. Bununla birlikte IRF aile üyeleri adaptif immün yanıtta, hücre farklılaşmasında ve tümör baskılamayı şekillendirmede de rol oynamaktadır. IRF ailesi üyelerinin birçok önemli rolü olmasına karşın, bu transkripsiyon faktörleri hakkında yapılan çoğu araştırma Tip I IFN indüksiyonundaki görevleri üzerine odaklanmaktadır [12,16-18].



Şekil 2.1. IRF3, IRF5 ve IRF7'nin dizi benzerliği [12]

2.4.1. İnterferon Düzenleyici Faktör 3 [Interferon Regulating Factor 3 (IRF3)]

İnterferon Regülatör Faktör 3 geni (IRF3) ilk olarak Expressed Sequence Tags (EST) veri tabanında IRF1 ve IRF2 genlerinin homologlarının araştırılması sırasında tanımlanmıştır. IRF3 proteini, IRF ailesinin bir üyesidir. Bu protein tüm hücre ve dokularda ifadesi olan önemli bir hücresel anti-viral sinyal molekülüdür ve birçok hücrede sitoplazma içerisinde inaktif formda bulunur.

IRF3 proteinini kodlayan gen, kromozom 19q13.3_q13.4 lokasyonunda bulunmaktadır ve 8 ekzon içermektedir [16].

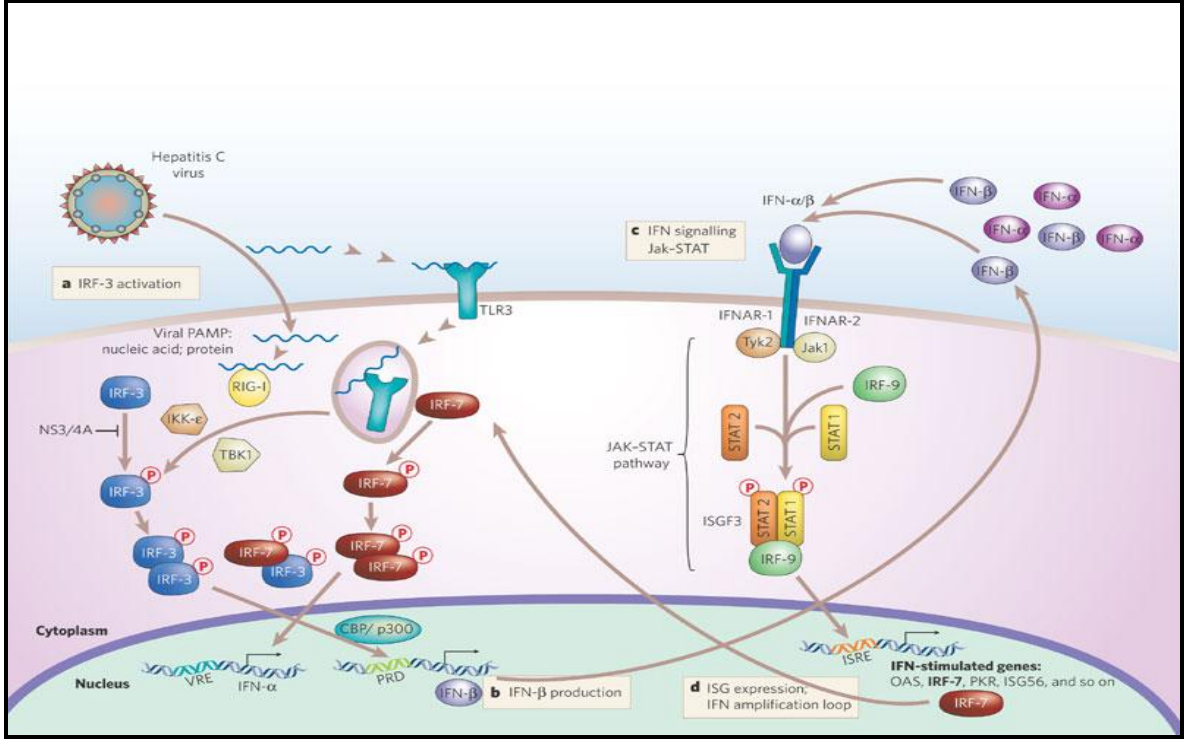
IRF3 proteini 55 kDa ağırlığındadır ve toplam 427amino asitten oluşur. IRF3 proteinin 2 önemli domaini vardır:

1. N-terminal DNA-bağlayıcı domain
2. C-terminal transaktivasyon domain

İki domain prolin amino asidi bakımından zengin olan bir bağlayıcı dizi ile birbirine bağlıdır. Bu bağlayıcıda, "Nuclear Export Signal (NES)" dizisi bulunur. Viral enfeksiyonlarda IRF3, CTD domain'inde bulunan Ser/Thr rezidularının

fosforilasyonu ile aktive olur. Bu fosforilasyondan dolayı, CTD domain'nin negatif yükü artar ve IRF3'ün dimer haline gelmesi sağlanır. Dimerize olan IRF3 molekülü sitoplazmadan çekirdeğe taşınır ve orada p300/CBP koaktivatörü ile birleşerek hedef genlerin (IFN- α ve IFN- β genlerinin) transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar [17,19,20].

İnterferon daha sonra hücreden ayrılır ve hücre-yüzey reseptörlerine bağlanır, JAK/STAT yolu olarak bilinen iyi karakterize edilmiş bir sinyal transdüksiyonuna yol açar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. JAK/STAT yolu (Hepatit C virüsünün hücre içi konak savunmasından kaçış yolu) Nature 436, 939-945 (18 August 2005)

Aktive edilmiş STAT proteinleri çekirdeğe taşınır ve IRF faktör p48 (ISGF3g) ile birleşerek ISGF3 kompleksini oluşturur. Bu kompleks sonra interferon-uyarılmış genlerin (interferon-stimulated genes (ISGs)) promotörlerinde mevcut olan interferon-hassas cevap elementine (interferon-sensitive response element ISRE) bağlanır ve ifadelerini aktive eder [21].

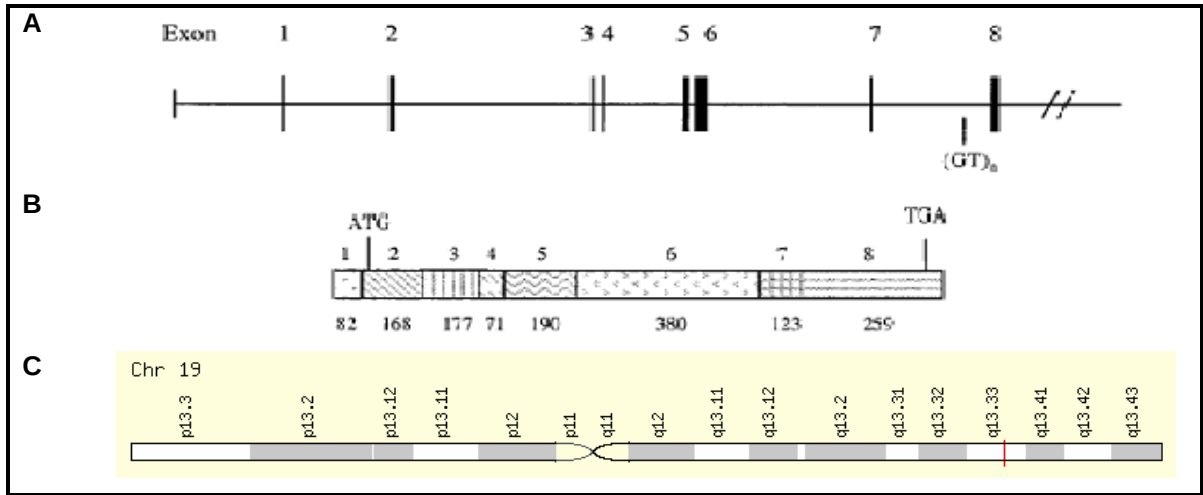
IRF-3'ün sürekli transfekte olan hücrelerdeki aşırı üretimi hücre büyümesini ciddi oranda etkiliyor gibi durmamaktadır. Bunun nedeni şu olabilir: uyarılmamış hücrelerde IRF-3, sitoplazma içinde inaktif olarak bulunur ve de etkin olması için fosforlanması şarttır. Viral enfeksiyonun IRF-3 fosforlanmasını indüklediği ve de

çekirdeğe doğru hareketlendirdiği bilinmektedir ki burada p300/CBP transkripsiyon koaktivatör ile birleşerek IFN- α , IFN- β olmak üzere hedef genlerin transkripsiyonuna yol açmaktadır. Gen transkripsiyonunu indükleyecek bir fosforlanmayı gerektirmeyen konstitütif olarak aktif IRF-3 yapısının ifadesi apoptoza yol açıyor gibi durmaktadır.

Viral enfeksiyon dışında IRF3'un fosforlanma ve aktivasyonu, diğer genlerin (inflamatuvar genler gibi) transkripsiyonuna da sebep olabilmektedir. Bu nedenle büyüme faktörleri tarafından IRF3'ün aktivasyonu hücre büyümesinin negatif kontrolüne yol açabilmektedir [16]. IRF3 geninin bulunduğu bölgenin gliomalarda genellikle delesyona uğramış olması tümör baskılayıcı bir role sahip olabileceğine dair bir kanıt oluşturmaktadır. IRF3 geninin promotorunda ve ilk intronunda çok sayıda GC tekrarları olması bu genin ifadesinin diğer tümör baskılayıcı genlere benzer şekilde, metilasyon yoluyla düzenlendiğini işaret etmektedir [16].

2.4.2. IRF3'ün Genomik Organizasyonunun Karakterizasyonu

IRF-3 proteinini kodlayan gen kromozom 19q13.3-q13.4'e yerleşmiştir ve 8 ekzonu bulunur [22,23]. Ekzon intron bağlantı bölgelerinin tamamı GT/AG konsensüsüne uyar. ATG translasyona başlama kodunu genin ikinci ekzonunda bulunur. IRF3'ün DBD'nin kodlama sekansı; ICSBP, IRF1 ve IRF2'ye benzer şekilde ikinci ve üçüncü ekzonlarda bulunur. İnsan IRF3 geninin intronları, tanımlanmış olan diğer IRF genlerine kıyasla çok daha kısadır. IRF3 genini içeren bölge, kromozom 19'un yaklaşık 7 kb'lık bölgesinde yer almaktadır. IRF3 geninin genetik organizasyonu şematik olarak Şekil 2.3'te ve nükleotit dizisi Şekil 2.4'te gösterilmektedir. IRF3 geninin cDNA ve aminoasit dizilimi ise Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. A) IRF3 genine ait promotor, 5' UTR, **B)** 1. ekzon, intronun organizasyonu ve **C)** kromozom üzerinde yeri [16]

>chromosome:GRCh37:19:50162229:50170632:-1

TGCAAGCAGTCTCTTTCCCAACTCCCTCCCTCCCCGCTGAGGACCTCTCTCCAAAACCCCAAAGACA
GAGAATAGAGCCAGATATAAAGAGAGGAGACAGACTGAGACCAGGAGCAAGAGTTAGGAGGGAGCCTCA
AATGCTGGCCCTGGGGGAGAAGGGCCACTCCTCTTACCTAGGTGGAGTTGGAACAGGAGACCCGGCAG
CCTCACCACGCCTAAGGAAGGCAGCTAGGACCTCAGCGTGTCTTCCCGAGCCCCAGCTCTTCAGAGC
CTGCCATGGAGGCACCTGTGAGAGAGAGGGTTAGGGACTGGACTCCAAGGGTTTAGCAAGAAGTGGAGG
CTTGGGGACCAGGACTTGTGAGTCCCAAGGAAGGTGCTGAGGGCCTGGACTCCTGGGTCTTTGGAGAG
TGTGGGTCTGGGGGCTAGACTCTTGAGTCTCAGACGAAAAAGCGATCAGGAAAAAGACTCTTCGATC
CAAGGAAAAGTGGTGGGGTGGGTGCCCCAGATTCTGTTGGTCTAAAGGAGGAGGGAGCTGGGGTCTTGA
CTTCTGAGTCTTAGAGAAAAAGGAAGTGGAGCCCCAGACCTTAGGTCTCCAGGAAGAAGAGGCTTAG
CGCCCCAACTCCTGGATTCTATAAGAGGCATATGCCAACTCCTGAAACCTTAAAGCATCGGGAACCTA
CCAATCCCAAGAGGTTTCAGGGCAAATCTTCCCCTAGGTCCGCGCTTCTTCGCGCGCAGCCTGCTGTG
AGGTGTAGTTCCAAATCTCCGACCCCTGCTGGAATCTAGAGGACCTGGACCTTGGATATCAGAGAAG
CGGACTGGGGTGCCCACTGGATCCCGGCCCTCTCTTCCCTCCTACCCACCCCTCGTCAAC
ACCCCGCTGACTGGTCCGGGGCCCCACCGCGCTCTCCACTCAACTTGCCTCTCCTCCACTGAAC
TCGTACAACTTTATTAGTTCAACTTTCCCGCGCTGCGCACTGGGCGGGTCGATAACCGGCCAGCG
TAGAAAGGGCGGAACGCTGGGTGCACGCTCAATTTGCATGTGACGCTCCAGCATGCCTCTGGCCGGAA
ACCCAAAAAGGGCATAGGGGCGGGAACAGCCAGCGGGCGTCCCATCGGCTTTTGGGTCTGTTACCC
AAAGAATGATAAAGTTGGTTTATTTCAAGAAGTCGATCAAAAGAAAGCCCCAGCGCTCTAGAGCTCA
GCTGACGGGAAAGGGGTGCGCAGCCTCGAGTTTGAAGCTACCCGAGCTCCAAGACAGGGGTGGGT
CCAGCTGCCCGCAGCCCCGACCTTCCATCGTAGGTAACGCGGAAGAGCCCGGAGAGCGTTGGTGGCG
TCCGAGAGCGAGGAGCGGAAAGAGGATGGGTCTGCACGGAGAGTGGAAGGCAGGCTGTGTACTCTGG
GGAAAGTGGAGCAAGGAAGGAGCTACAGTGCCGACGCTGGAGGT

intron

CGGCTGCAGAAAACTAGAAAAAGTAGGGAGGAAAGAGGAAAGAGGAGGCGTCTACACTGAGGGGTT
CTAGAGAGGGAGGGTGGACTCCGTAGATGGGGTAGTTTCACTCTCGAAACCTGGGGCGTCTGTGTC
TGGAGGAGGAGGCGGGCAGTTCGAGGGGAATTGAATGGAAGTTCTGTGTTGAAATGTTTGGGAGAT
CTTCTGTAGGGGACTGTGGAAGGGGTCTACATTGGGGTAAGTGCAGGAGGTAGAGGCTTACACGTGA
ATCGATTCTGCACTGAAATAACTAGGGAAGAGGATGCTACCTGAAAGTGGGGATACTTACTTTCGAT
GATGTGGGGAGGAGGAGGTCTATACTGGCGGAATTGAGGGAGTGGAGGGTCTGCACTGAAGACGCTG
GGGAAGGATGTGCCATGGATATGGGAAGGAACCTAGCTGATTAGAGAGCCTCTCGGGAGGATGGGAGG
ATGGGAAGAGGAGGTTTCTGTTGTACCCCGAAAAATATGGGTGAAGGACCTGTGCCGTGGCCCGTGA
GAAGGAGTCTGGGTGCGGAACTCCAGGCCAGGTGGGTCCGGGGAGGCGGTCGCGCCAGGAAATG
CCCTATACGCGCAGGCCGGACCTGGGAACCCAAAGCCACGGATCCTGCCCTGGCTGGTGTGCGCAGCT
GGACCTGGGGCAACTGGAGGGCGTGGCTGGGTGAACAAGAGCCGACGCGCTTCCGATCCCTTGGAA
GCACGGCTACGGCAGGATGCACAGCAGGAGGATTTCCGAATCTTCCAGGTGCGTGCACGACCTGGGA
CG

intron

CTGGAACCCGGAGCTGCGCGCTGGGCGGAAAGGACTCCTAGTGGGCCCCGGCTGAGAAGGCGGAGGTGG
 CGCGCAGAGGGGCGGGCTCGTGCCAACGCTGGTGGGTGGGGCTAGAACGGGAGGGGCGGGGCTAGCCGGA
 TCCGCTGACTGATGGTGGGGCGCAAGCAGGTTGGAGCTGCAGGGTTACGGGAATAAAACCGGGAAGC
 CGGTTAGTACGCAAAGGAAATGCATCCTGGGGGTTTGGGGCTTTCTAGAGGCCGGGGCTCTTGTTGTA
 GGATAGATACTGGGGGATGGTTCTTGAACATCAGAGGTGAGGCCTGGAGCCCCAAATCTGAGGTTCTT
 AACTACCGAATTAGTATATGCCAGAGGTGGTAAACAGTGTGAGGGGCGGGTTATCACAGAGGGTGTCTG
 CGGGGCAGGTGGTGCACGGGATTAGACACCAAGTTGGACTTGGAAAGCCTGGCTTAGAAAGAAAAGGTTT
 TTGGGCCGGGGCGGTGGTTACACCTGTAATCCTAGCACTTTGCAAGGCCAAGGCGGGAGGATCGCTT
 GAGCCCAGGAGTTTGAGGCCAGCTTGGGCAACATAGGCTCCATCTCTTTAAAAACAAAAGCGAAACAAA
 ACAAAAACCAAAGAGGTTTCAAAGGCTTTTGAAGAGGCCGAGCACAGTAGCTCATGCCTGTAATCCCAG
 CACTTTGGGAGGCCGAGGAGGACGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAAACATGGT
 GAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGTGTAGTGGTGCCACCTGTAATCCCAGCTA
 CTCAGGAGGCTGAGACAGGAGAATCGCTTGAAACGGGGAGGCGGAAGTTGCAGTGAGCTGAGATTGCAC
 CATTGCATTCCAGCCTGGGTGACAGGAGTGAAACTCCATCTCAAAAAGAAAAAAGCCTTTTGAAAACT
 AGAGGTGGGGGATGGAGGTAGGTGGGACGGGGGATTGGGGATGGACCTTGACAGAGTTAGAACTTGCC
 AGGGAAGAGGGTGGTGTTAGGACTCGGGAGACAGGGTTAGGGCCCCAGGAGCAGGATCTAAGTCGTCC
 TCCCCACCATCTGACACCCTGTTGCCCCAG**GCCTGGGGCCGAGGCCACTGGTGCATATGTTCCCGGG**
AGGGATAAGCCAGACCTGCCAACCTGGAAGAGGAATTTCCGCTCTGCCCTCAACCGCAAAGAAGGGTTG
CGTTTAGCAGAGGACCGGAGCAAGGACCCTCACGACCCACATAAAATCTACGAGTTTGTGAACCTCAG_{GT}
 CTGCCAGCTTGGGGTTC

} Ekzon 3

GTGTGGGAGGCTGGGGCCCCAAGGTTTCTGGCACTCCTACTCCCCTCACCACCTTTTCTCAACAG**GAGT**
TGGGGACTTTTCCCAGCCAGACACCTCTCCGGACACCAATGGTGGAGGCAGTACTTCTGATACCCAG_{GT}
 GAGAATGTGCCAACTTTTCATGCCCCCTCAGTCTCCGACCTGTCTCCATGGGCCTTGTCTCTCCCTCTA
 GACGATCCCCCCTACTCCCCTGCCTCCAGCCTGCCCTCACCTGAGCCAGTGCTGACCCTGTCTGTCCCT
 GCCCGGTCTCCTCAGGAGAAAATTCCAAGTCTTACCCAGCATTCAAGGCCGAGCACACCTTCCCGG
 GATTTTCATGGATTTTCGATTTCGACAGGGGGCTGTGACGCTCTTGGGAACCTGAAAACTCCCTCACCTTGAT
 CCTGCTGAGGCCCAAGCTGGGGGAGCATCCCCTCTGAAATTCTACCCAGCCTGCTTTGCCCAGGTCTTA
 CCTGCATAGAGCCAGATCCTTGGGTTGGAATGGTAGCACCTGGCGTTTATTAGTGTTTGTGGCTGTT
 GATGCCATGGCTGGCTCTGTCCCAGGCTGGAAGCCCCCTTGAAGCGAGAGCTCAAGCCTGACCTCCCTG
 CGTTGCTGAGAACAGACCTGGTCCATATGAAGTCTCCAGAAAA

} Ekzon 4

intron

GGATATGGAAATGCCTGATTCTCTTTTTTTGTTTCCCTCCAG**GAAGACATTCTGGATGAGTTACTGGGT**
AACATGGTGTGGCCCCACTCCCAGATCCGGGACCCCCAAGCCTGGCTGTAGCCCCCTGAGCCCTGCCCT
CAGCCCCCTCGGGAGCCCCAGCTTGGACAATCCCACTCCCTTCCCAAACCTGGGGCCCTCTGAGAACCCTA
CTGAAGCGGCTGTTGGTGCCGGGGGAAG_{GTGAGTGTACAGCTG}

} Ekzon 5

intron

CAGGCTGGGAGGGCTGAGGTCTGGGCGGCAGCCCCCTGATTCTCAACCCCTCTCCCCTTCATGCCGCTGC
 TGCCGCTGCTCAG**AGTGGGAGTTTCGAGGTGACAGCCTTCTACCGGGGCCGCCAAGTCTTCCAGCAGACC**
ATCTCTGCCCCGAGGGCCTGCGGCTGGTGGGGTCCGAAGTGGGAGACAGGACGCTGCCTGGATGGCCA
GTCACACTGCCAGACCTGGCATGTCCCTGACAGACAGGGGAGTGATGAGCTACGTGAGGCATGTGCTG
AGCTGCCTGGGTGGGGGACTGGCTCTCTGGCGGGCCGGGCAGTGCTCTGGGCCAGCGGCTGGGGCAC
TGCCACACATACTGGGCAGTGAGCGAGGAGCTGCTCCCCAACAGCGGGCATGGGCCTGATGGCGAGGTC
CCCAAGGACAAGGAAGGAGGCGTGTGTGACCTGGGGCCCTTATTGTAG_{GTGAGTGAGACAGGGGCTTC}
 GACCTGGCCAGTACAAAGCAGCCTGCACAGTGGTTAACAACCTCAGGATTGGCCGGGCACGGTGGCTCAC
 GCCTGTAGTCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGTGGGCAGATGACAAGTTCAGGAGTTTCGAGACCAGCCT
 GGTCAACATAGTGAAACCCCATCTCTACTAAAGATACAAAAAATAGTCGGGCGTGGTGGCAGCTGCCT
 GTAATCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCAGGAGGCGGAGATTGCAGTGA
 GCTGAGATCGCACCACTGCACTCTAGCCTGGTGACAGAGTAAGACTCCATCTCGAACAACAAAAA
 AGAACTCATGATTAGGACTGAATTCAGACGCTGGCTGCCCTTGGCCCGCTGTATAACCGAGGCAAAGGA
 CTTTGCCCTGAGCCCGTGAATCCAAGGATGGTCTCTCTCTCTACCTGCCTGCCAGCGCTGGGGTGAG
 ACACAGGCCAGTACACAGAGCCTGCTCAGGGAATTAGCTGCCACTGTCATCATCATCGTAACATAATGA
 TGGTGAACAGACCAATAGCAGGAAAGCTACATCCCTTAGGGTTTCGCTGTGCACTGGCACCTTCTGCCA
 TGATGGAAATGACAGTCACTGCACTGTCCGGTGCAGCAGCCACTAGCCACAGGGGCCAAGCACTCAGG
 TGAGGCGAGTGCAACCAGGACGTGATTCTGTTTAAATTGGTTACAATTTAACTGAAATAACCTTACATG
 ACTAATGGCTGCAATTGGACAATGCAGCCTCAGACAGGACTGAATGCCAACAGCTTCTCCAGATTAC
 TGAGCATCCTTGGGAGCATGGGCCCCCTACTCTGGGCTGTTATGAATGCTGAGGCTTGGGGGCTTGGG
 GGTGTGGCTTCCAACAACCCACCTGATGGGAGGGAGGGAGGGAAGGAGGGGACTTTCCCCAA
 ACAAGCAGTCCCCTGGTTCAGGCAGCAGAGGGCCTTAGGTCAGGG

} Ekzon 6

intron

```

GGAGAGTGGAAAGGCAGGCTGTGTACTCTGGGGAAAGTGGAGCAAGGAAGGAGCTACAGT
.....
GGCCGACGCTGGAGGCCGACCATGGAACCCAAAGCCACGGATCCTGCCCTGGCTGGT
..... -M--G--T--P--K--P--R--I--L--P--W--L--V
GTTCGAGCTGGACCTGGGGCAACTGGAGGGCGTGGCTGGGTGAACAAGAGCCGCACGCG
--S--Q--L--D--L--G--Q--L--E--G--V--A--W--V--N--K--S--R--T--R
CTTCCGCATCCCTTGGGAAGCACGGCTACGGCAGGATGCACAGCAGGAGGATTTTCGGAAT
--F--R--I--P--W--K--H--G--L--R--Q--D--A--Q--Q--E--D--F--G--I
CTTCCAGGCCGCTGGGCCGAGGCCACTGGTGCATATGTTCCCGGGAGGGATAAGCCAGACCT
--F--Q--A--W--A--E--A--T--G--A--Y--V--P--G--R--D--K--P--D--L
GCCAACCTTGAAGAGGAATTTCCGCTCTGCCCTCAACCGCAAAGAAGGGTTGCGTTTAGC
--P--T--W--K--R--N--F--R--S--A--L--N--R--K--E--G--L--R--A
AGAGACACCGGAGCAAGGACCTCACGACCCACATAAAATCTACGAGTTTGTGAACTCAGG
--E--D--R--S--K--D--P--H--D--P--H--K--I--Y--E--F--V--N--S--G
AGTTGGGGACTTTTCCAGCCAGACACCTCTCCGGACACCAATGGTGGAGGCAGTACTTC
--V--G--D--F--S--Q--P--D--T--S--P--D--T--N--G--G--G--S--T--S
TGATAACCAGGAAGACATTCTGGATGAGTTACTGGGTAAACATGGTGTGGCCCCACTCCC
--D--T--Q--E--D--I--L--D--E--L--L--G--N--M--V--L--A--P--L--P
AGATCCGGGACCCCAAGCCTGGCTGTAGCCCTGAGCCCTGCCCTCAGCCCCTGCGGAG
--D--P--G--P--P--S--L--A--V--A--P--E--P--C--P--Q--P--L--R--S
CCCCAGCTTGGACAATCCCCTTCCCAAACCTGGGGCCCTCTGAGAACCCTGAA
--P--S--L--D--N--P--T--P--F--P--N--L--G--P--S--E--N--P--L--K
GCGGCTGTTGGTGCCGGGGGAAAGAGTGGGAGTTTCGAGGTGACAGCCTTCTACCGGGGCCG
--R--L--L--V--P--G--E--E--W--E--F--E--V--T--A--F--Y--R--G--R
CCAAGTCTTCCAGCAGACCATCTCCTGCCCCGAGGGCCTGCGGCTGGTGGGGTCCGAAGT
--Q--V--F--Q--Q--T--I--S--C--P--E--G--L--R--L--V--G--S--E--V
GGGAGACAGGACGCTGCCTGGATGGCCAGTCACTGCCAGACCCTGGCATGTCCCTGAC
--G--D--R--T--L--P--G--W--P--V--T--L--P--D--P--G--M--S--L--T
AGACAGGGGAGTGATGAGCTACGTGAGGCATGTGCTGAGCTGCCTGGGTGGGGGACTGGC
--D--R--G--V--M--S--Y--V--R--H--V--L--S--C--L--G--G--G--L--A
TCTCTGGCGGGGCCGGGCAGTGGCTCTGGGCCAGCGGCTGGGGCACTGCCACACATACTG
--L--W--R--A--G--Q--W--L--W--A--Q--R--L--G--H--C--H--T--Y--W
GGCAGTGAGCGAGGAGCTGTCCCCAACAGCGGGCATGGGCCTGATGGCGAGGTCCCCAA
--A--V--S--E--E--L--L--P--N--S--G--H--G--P--D--G--E--V--P--K
GGACAAGGAAGGAGGCGTGTGTTGACCTGGGGCCCTTCATTGTAGATCTGATTACCTTCAC
--D--K--E--G--G--V--F--D--L--G--P--F--I--V--D--L--I--T--F--T
GGAAGGAAGCGGACGCTACCCACGCTATGCCCTCTGGTTCTGTGTGGGGAGTCATGGCC
--E--G--S--G--R--S--P--R--Y--A--L--W--F--C--V--G--E--S--W--P
CCAGGACCAGCCGTGGACCAAGAGGCTCTGTGATGTTCAAGGTTGTGCCACGTGCCTCAG
--Q--D--Q--P--W--T--K--R--L--V--M--V--K--V--V--P--T--C--L--R
GGCCTTGGTAGAAATGGCCCGGGTAGGGGTGCCCTCCTCCCTGGAGAATACTGTGGACCT
--A--L--V--E--M--A--R--V--G--G--A--S--S--L--E--N--T--V--D--L
GCACATTTCCAACAGCCACCCACTCTCCCTCACCTCCGACCAGTACAAGGCCCTACCTGCA
--H--I--S--N--S--H--P--L--S--L--T--S--D--Q--Y--K--A--Y--L--Q
GGACTTGGTGGAGGGCATGGATTTCAGGGCCCTGGGGAGAGCTGAGCCCTCGCTCCTCA
--D--L--V--E--G--M--D--F--Q--G--P--G--E--S--*--.....
TGGTGTGCCTCCAACCCCCCTGTTCCTCCACCACTCAACCAATAAACTGGTTCCTGCTAT
.....

```

Şekil 2.5. IRF3 geni cDNA ve aminoasit şifreleyen bölgelerinin dizilimi (<http://www.ensembl.org>).

Genin promotor ve 5' ucunda bulunan ve translasyona uğramayan bölgesi, c-Myc, SP-1 ve AP-2 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini içerir. IRF3'ün 5'UTR bölgesinde yer alan intronun rolü henüz bilinmemektedir, ancak

fonksiyonel c-Myc bağlanma bölgeleri çoğunlukla bu introna yerleşmiştir. Üç SP-1 bağlanma bölgesine ek olarak diğer IRF genleri promotorlarında tespit edilemeyen HOX kutusu, CArG/SRF, USF elementi ve NF-1 bağlanma bölgesi gibi bazı özgün bölgelerin bulunduğu gösterilmiştir [16].

IRF3 promotoru, TATA kutusu ya da CCAAT kutularını içermemektedir. Türler arasında korunmuş olan bu yapılar IRF1 ve IRF2 genlerinde de bulunmamaktadır. IRF3geni, TATA kutusunun bulunmadığı promotorlarda transkripsiyonun başlamasını sağlayan başlangıç elementinin bağlanacağı bir bağlanma dizisine de sahip değildir. IRF3 geninin minimal promotor bölgesi GC nükleotidlerince zengindir. IRF3 geninin olası transkripsiyonel başlangıç bölgesine yakın olan minimal promotor bölgede yer alan NF-1 bağlanma dizisinin IRF3'ün transkripsiyonunu başlatabileceği öngörülmektedir. IRF3'ün 5' ucunda yer alan promotor bölgesinin delesyon analizinde transkripsiyon başlangıç bölgesinin ilk 113 nükleotidlik kısmında temel promotor aktivitesi görülmüştür. Bu bölge içinde SP-1 ve HOX DNA-bağlayıcı bölgesi bulunmuştur.

IRF3'ün ilk intronunun AP-2 ve SP-1 bağlayıcı elementlerine sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca bu bölgede bir de c-Myc için bağlanma dizisi mevcuttur. Ancak bu bölgenin fonksiyonel bağlantısı halen soru işaretidir. IRF3promotoru aynı zamanda NF-κB ve IRF1 için ayrı bağlanma bölgeleri içerir ancak bu iki bölgenin fonksiyonel olduğu düşünülmemektedir. IRF-3 genine ait promotor, 5'UTR, 1. ekzon, intronun nükleotit dizisi ve Türk toplumunda belirlenen 5 adet SNPlerin yeri Şekil 2.6'da gösterilmektedir [16].

ATTCGGATCCAAGGAAAAGGTGGTGGGGCTGGGTGCCCCAGATTTCGTGGGTCTAAAGGAGGAGGGAG	-694
AP-1 like	
CTGGGGTCTGGACTTCTGAGTCTTGAAGAAAAAGGAACTGGAGCCCCAGACCCTTAGGTCTCCCA	-628
GGAAGAAGAGGCTTAGCGCCCCAACTCCTGGATTCTATAAGAGGCATATGCCAACTCCTGAAACC	-562
CTTAAAGCATCGGGAACCTACCAATCCCAAGAGGTTTCAGGGCAAATCTTCCCCTAGGTCCGCGCTTC	-496
TTCGCCGCGCAGCCTGCTGTGAGGTGTAGTTCCAAATCTCCGACCCCTGCTGGAATCTAGAGGACCC	-430
TGGACCCTTGGATATCAGAGAAGCGGGACTGGGGTGCCCCACCACTGGATCCCGCCCCCTCCTCTTC	-364
CCTCCTCACCCACCCCTCGTCAACACCCCGTGACCTGGTCCGGGGCCCCACCGCCGCTCCTCCA	-298
CTCAACTTGGCGTCTCCTCCACTGAACTCGTACAACTTTATTAGTTCAACTTCCCAGCGCTGCGCA	-232
Sp1	
CTGGGCCGGGTGATAACCGGCCAGCGTAGAAAAGGGCGGAACGCTGGGTGCACGCTCAATTGCA	-166
USF	
USF	
NFkb like	
SRF/CaRG	
Sp1	
TGTGACGCTCCCAGCATGCCTCTTGCGGAAACCCAAAAAGGCGCATAGGGCGGGAACAGCCCA	-100
Sp1	
HOX	
GCAGGGCGTCCCATCGGCTTTTGGGTCTGTTACCCAAAGAAATGATTAAAGTTGGTTTATTCAAGAA	-44
rs2304204 IRF-1 like rs3204440 rs2304206 rs2304205 rs139412285 +1	
GTCGATCAAAAAGAAAGCCCCAGCGTCTAGAGCTCAGCTGACGGGAAAGGGGGTGCGCAGCCTC	20
GAGTTTGAGAGCTACCCGGAGCTCCAGACAGGGGCTGGTTCCAGCTGCCCGCACGCCCCGACCTT	86
CCATCCTAGGTAACGCGGAAGAGCCCGGGAGAGCCATGGTGGCGTCCGAGAGCGAGGTAGCGGG	152
AAAGAGGATGGGTCTGCACGGAGAGTGGAAGGAGGCTGTGTACTCTGGGAAAGTGAGCA	215
AGGAAGGAGCCACAGTGGCCGACGCTGGAGGTCGGCTGCAGAAAACTAGAAAAAGTAGGGA	278
GGAAAGAGGAAAGAGGAGGCGTCTACACTGAGGGGGTTCTAGAGAGGGAGGGGTGGACTC	341
CGTAGATTGGGGGTAGTTCACTCTCGAAACCTGGGGCGTGCTCTGTCTGGAGGAGGGAGGCGG	404
GCAGTCGGAGGGGAATTGAATGGAAGTTCTGTGTTGGAATGTTTGGGAGATCTCTGTAGGGG	467
C-Myc	
GACTGTGGAAGGGGGTCTACATTGGGGTAAGTGCAGGAGGTAGAGGCTTACAGTGAATCGATT	530
CTGCACTGAAATAACTAGGGAAAGAGGATGCTACCTGAAAGTGGGGATACTTACTTTTCGATGA	593
TGTGGGGGAGGGAGGAGGACTATACTGGCGGAATTGAGGGAGTGGAGGGTCTGCACTGAAGAC	666
GCTGGGGAAGGATGTGCCATGGATATGGGAAGGAACCCTAGCTGATTAGAGAGCCTCTCGGGA	739
GGATGGGAGGATGGGAAGAGGAGGTTTCTGTGTTGTACCCCCGAAATATGGGTGAAGGACCTGT	802
GCCGTGCCCGTGAAGAGGAGTCTGGGTGCGTTTCTCAGGCCAGGTGGGTCCGGGGGAGGCCG	865
GTCGCGCCAGGAAATGCCCTATACGCGCAGCCGACCATGGGAACCCCAAAGCCACGGAT	931
CCTGCCCTGGCTGGTGTGCGAGCTGGACCTGGGGCAACTGGAGGGCGTGGCCTGGGTGAACAAGAG	1097

Şekil 2.6. IRF-3 genine ait promotor, 5'UTR, 1. ekzon, intronun nükleotit dizisi ve Türk toplumunda belirlenen 5 adet SNPlerin yeri [16]

2.4.3. İnterferon Regülatör Faktör 3 ve Hastalıklar

Belirtildiği gibi IRF3 önemli bir hücrel antiviral sinyal molekülüdür. Virüs enfeksiyonu sonrasında; IRF3, karboksil ucundaki reziduların fosforilasyonu ile aktif hale getirilir; sonrasında yer değiştirerek hücre çekirdeğine hareket eder ve burada hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır [17,24]. IRF3, ayrıca, ultraviyole ışık ve bazı kimyasallar gibi DNA'ya zarar veren çevresel stresler tarafından da aktif hale getirilir [25]. IRF3 faktörünün aşırı ekspresyonu, normal hücrelerde p53

ve p21'i aktive ederek hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. IRF3 faktörünün insan kanser hücrelerinde ektopik ekspresyonu ise *in vivo* tümör formasyonunu azaltmıştır [26,27]. Ayrıca, DNA-bağlayıcı domain bulunmayan bir dominant negatif mutant IRF3'te onkojenik potansiyel olduğu görülmüştür [28]. Tüm bu çalışmalar, IRF3'ün tümör baskılayıcı gen işlevini yerine getirebileceğini göstermektedir. Başka bir IRF üyesi olan IRF1'in tümör baskılayıcı bir gen olduğu bilinmektedir; ayrıca birçok insan kanseri vakasında, fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar bildirilmiştir [29]. Ancak, şimdiye kadar, hiçbir insan kanseri türünde, IRF3'e ilişkin hiçbir fonksiyon kaybına yol açan mutasyon bildirilmemiştir. Bu durum, IRF3'ün gerçekten tümör baskılayıcı bir gen olup olmadığına ilişkin bir tartışma başlatmıştır.

Hepatit C virüs ve İnfluenza A virüs gibi bazı virüsler, interferon regülatör 3 değişik yoldan fosforilasyonu gerçekleştiren enzimi (Virus Activated Kinase) inhibe ederek veya IRF3 benzeri bir molekül sentez ederek inaktive edip hastalıklara yol açarlar [30,31]. Suarez ve arkadaşlarının çalışmasında IRF3 geninin sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalığıyla genetik ilişkisini araştırmışlar ama sistemik lupus eritematozda, interferon düzenleyici faktör 3'ün genetik ilişkisine dair hiçbir kanıt bulunamamıştır [32]. İnfluenza A ve Respiratuvar Sinsital hastalıklarda da alt hava yolu semptomları gelişen çocuklarda, sonrasında astım semptomları gelişme riski yüksektir ve ayrıca interferonların (IFN α/β) transkripsiyonel düzeyde kısıtlamaları da gözlenmiştir. IRF-3'un bu özellikleri astım hastalığıyla da ilişkili olabilmektedir.

2.5. Astım

Astım, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı geri dönüşümlü hava yolu daralması, bronş aşırı duyarlılığı ve hava yolu inflamasyonu ile karakterize edilen, mekanizması tamamiyle aydınlatılmamış kompleks bir hastalıktır. Nöbetler halinde gelen nefes darlığı, hırıltılı solunum ve sıklıkla bunlara eşlik eden öksürük astımın klinik özellikleridir. Astım hastalığının başlıca fizyolojik özelliği hava akımı kısıtlanması ile tanımlanan hava yolu daralmasıdır [33]. Astım çocukluk çağının en sık rastlanan kronik hastalıklarından biridir. Çocuklarda astım hastalığı sıklıkla atopik bir zemin üzerinde gelişmektedir. Atopiden sorumlu olan allerjenler arasında polenler, ev tozu akarları, mantarlar, hayvan antijenleri ile besinler sayılabilir. Allerjenler, bireyin immün sistemini uyarak o maddeye karşı özel bir yanıt oluşumuna neden olur. İmmün sistem tarafından allerjene karşı antikorlar üretilir;

hasta aynı allerjenle yeniden karşılaştığında önceden oluşmuş antikorlar devreye girer ve ortaya çıkan immün reaksiyon akut astım atağına neden olur. Atopik astımlı bireylerin aile öyküsünde astım, allerjik rinit (saman nezlesi) ve infantil (bebeklik çağı) egzema gibi diğer atopik hastalıklara sıklıkla rastlanır. Atopik hastalarda duyarlı oldukları allerjene karşı deri testleri ve serumda allerjene özgül IgE testleri pozitif sonuç verir [34]. Ancak atopinin gösterilemediği astım olguları da vardır ve yetişkin yaşta non-atopik astım daha sık görülmektedir [34,35].

2.5.1. Astım Epidemiyolojisi

Astımın dünyada yaklaşık 300 milyon kişiyi etkilediği düşünülmektedir. Dünyanın farklı bölgelerinden bildirilen çok sayıda araştırma sonuçları, prevalans oranlarında büyük farklılıklar olduğunu göstermektedir. Çocuk ve erişkinler için nispeten standardize edilmiş ve karşılaştırılabilir yöntemlerle yapılan araştırmalarda, bu rakamların farklı ülkeler arasında değiştiği bulunmuştur. Bazı ülkelerde astım sıklığı artış eğilimi göstermektedir. Dünyada astım hastalığı nedeniyle yılda yaklaşık 250.000 kişinin öldüğü tahmin edilmektedir [35].

Prevalans ve mortalite rakamları arasında net bir ilişki bulunmamıştır. Çocukluk dönemi astım epidemiyolojisi araştırmaları temelde üç farklı yöntem kullanılarak yapılmıştır. Bunlar Çocukluk Çağında Astım ve Allerji için Uluslararası Araştırma [International Study for Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)] anketi, Amerikan Toraks Derneğinin uyarlamış olduğu Anket ve Aberg anketleridir. Erişkinlerdeki araştırmaların hemen hemen tamamı ise European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) anketidir. Bu araştırma sonuçlarına göre astım prevalansının çocuklarda %2-15 ve erişkinlerde ise %2-5 arasında dağılım gösterdiği görülmektedir. Bazı çocukluk dönemi çalışmalarında elde edilen yüksek prevalans değerleri astım prevalansının yaşla azaldığını düşündürmektedir. Bununla birlikte elde edilen yüksek prevalans değerlerinin çocukluk dönemindeki bazı hırıltı ile seyreden hastalıkların yanlış astım tanısı ile değerlendirilmesi sonucu olabileceği de düşünülmektedir [35,36].

Astım prevalansı Türkiye’de şehirler ve bölgeler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Genelde kıyı kesimleri, büyük şehirler ve düşük sosyoekonomik yaşam koşullarında astım görülme sıklığı daha yüksektir. Astım çocukluk çağında erkeklerde, erişkin dönemde ise kadınlarda daha sık görülmektedir. Büyük şehirlerde yapılan araştırmalar, bazı bölgelerde prevalansın artış eğiliminde

olduğunu göstermektedir [37,38]. Ülke çapında morbidite, mortalite ve maliyete ilişkin bilgiler yeterli değildir.

Türkiye’de çocuk ve erişkinlerde yapılan bölgesel prevalans çalışmaları ve risk faktörleri Çizelge 2.1’de özetlenmiştir [35].

Çizelge 2.1. Türkiye’de çocuk ve erişkinlerde yapılan bölgesel prevalans çalışmaları ve isk faktörleri

Şehir	Çocuk/Erişkin	Prevalans	Yıl	Yöntem
Ankara	Çocuk Erişkin	%6,4 %3	2002 1999	Aberg
Adana	Çocuk	%12,6	1997	ISAAC
Afyon	Çocuk	%7,	2000-1	ECRHS
Antalya	Erişkin	%9,4	2006	ECRHS
Bursa	Çocuk	%14,8	2006	ISAAC
Diyarbakır	Çocuk	%14,1	2001	ISAAC
Edirne	Çocuk	%16,4- %5,6	1997	Aberg
Elazığ	Erişkin	%31- %5,5	2002	ECRHS
Eskişehir	Üniv. Öğr	Astım benzeri %17	1997-8	ECRHS
İstanbul	Çocuk	%17	1996-7	ISAAC
İzmir	Çocuk	%7,2	2006	ISAAC
Manisa	Erişkin	%1,2	2006	ECRHS
Samsun	Çocuk	%2,3	2006	ISAAC
Sivas	Erişkin	%4,5	2003	ECRHS
Urfa	Çocuk	%1,9	200	ISAAC
Zonguldak	Çocuk	%4,9	2006	ISAAC

2.5.2. Astımda Risk Faktörleri

Risk faktörleri; bireyi astıma yatkın kılan kişisel faktörler (genetik, obezite, cinsiyet) ve çevresel faktörler (allerjenler, enfeksiyonlar, mesleki duyarlaştırıcılar, sigara, ev içi ve ev dışı hava kirliliği) olmak üzere iki grupta toplanabilir. Astım gelişmesine yol açan faktörlerin yanı sıra astım semptomlarını tetikleyen faktörler de vardır [39-41].

Genlerin hem kendi aralarında, hem de çevresel faktörler ile etkileşerek bireyin astıma eğilimini artırdıkları düşünülmektedir. Astımın ortaya çıkmasında etkili risk faktörlerinin başında genetik faktörler gelir (42). Yapılan aile çalışmaları göstermektedir ki, anne babadan birinin astımlı olması durumunda çocukta astım görülme riski %20-30’a yükselmekte, anne ve babanın her ikisinin de astımlı olması durumunda bu risk %60-70’e kadar ulaşmaktadır. Astım hastalığı üzerinde yapılan ikiz çalışmaları hastalığın genetik yönüne dair kuvvetli kanıtlar sağlamıştır. Bu çalışmalarda, ikizlerden birinde astım görülme durumunda diğesinde de

görölme sıklığının yüksek olduğu, hatta bu sıklığın tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir [43,44].

Astım patogeneğinde birçok gen rol oynamaktadır. Farklı popölasyonlarda yapılan çalışmalar bu hastalık ile ilişkili olabilecek çok sayıda kromozomal bölge belirlemiştir. Daha önceki çalışmalar özellikle bazı lokalizasyonlar (5q, 11q, 6p, 12q, 13q ve 16p) üzerinde yoğunlaşmaktadır. Popölasyon ve linkaj çalışmalarının birlikte analiz edildiği çalışmalarda birçok genin astımla ilişkisi olabileceği gözlemlenmiştir (Çizelge 2.2) [44-46].

Çizelge 2.2. Astım hastalığı ile ilişkili bazı genler ve kromozom üzerinde yerleri [47]

Gen	Kromozom	Pozisyon	Bu SNP'lerin incelendiği çalışma sayısı (farklı popölasyonlarda)
ADAM33	20	3596621-3610738	9
IL4	5	13203772-132046267	11
TNF	6	31651329-31654089	17
DENN1B	1	97715780-97716684	8
ORMDL3	17	35330822-35337380	8
IL4 R	16	272325227283599	7
PHF11 4	13	48967802-49001117	4
PTGDR	14	51804181-51813191	5

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda astımla ilişkili olabileceği düşünölen yeni aday genler ortaya konulmuştur (Çizelge 2.3) [47].

Çizelge 2.3. Astımın gelişmesinde rol oynadığı düşünölen aday genlere örnekler

Kromozom	Aday genler
5q	Th2 sitokin kümesi (IL3,5, 9)
4q	HHIP
4q	FAM13A

2.5.3. Astım ve Enfeksiyonlar

Bazı çalışmalarda, paraziter enfeksiyonların atopik hastalıkların gelişimi için risk faktörü olduğu saptanmıştır [48]. Patojenle enfekte olunduğunda konakçı tarafından geliştirilen antiviral cevapta ilk önemli adım virüslerin hücreler tarafından tanınmasıdır. Patojen tanıma reseptörleri (Patogen recognition receptor: PRR'ler) adı verilen reseptörler bu görevden sorumlu reseptör ailesidir.

PRR'lerin en önemli üyelerinden biri Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler)'dir. TLR'ler hücrede yerleşimlerine göre sınıflandırılmaktadır.

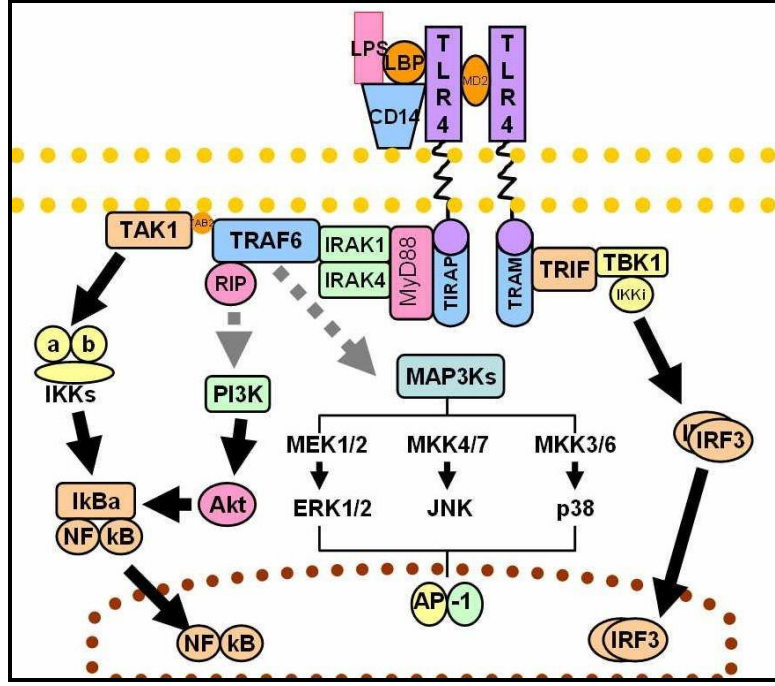
Genetik materyali çift zincirli RNA (dsRNA) olan virüsler TLR3'e, bakteriyel endotoksin lipopolisakkarit (LPS) ise TLR4'e bağlanır ve IRF3 sinyal yolunu aktive ederek tip I IFN'ların salgılanmasına sebep olmaktadır. LPS, TLR4 tarafından tanınır; tanıma işlemi bir çok molekülün görev aldığı kompleks bir olaydır. Tanıma kompleksinin diğer önemli parçası ise CD14' dür.TLR4 doğal immün sistemin güçlü bir uyarıcısı iken CD14, LPS için yüksek afinitesi olan bir reseptördür ve LPS için esas olarak bir ko-reseptör gibi fonksiyon görmektedir [49].

2.5.4. Astım ve İnflamatuvar Hücreler

Astım, hava yollarının inflamatuvar bir hastalığıdır ve inflamasyon oluşumunda çok sayıda hücre, sitokin, kemokin ve adhezyon molekülü rol oynamaktadır. İnflamasyonda mast hücreleri ve eozinofiller dışında, T hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, bazofiller ve yapısal hücreler gibi çok sayıda hücre çeşidi görev almaktadır [50,51].

Astımda etkili hücresel yollardan biri endotoksin sinyal yoludur (Şekil 2.7). Endotoksinler, Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarının bir parçasıdır ve çevrede yoğun olarak bulunur. Endotoksin ile karşılaşma süresi ve doz miktarına ilave olarak endotoksinle karşılaşan kişinin genetik yapısının, karşılaşma sonunda verilen immünolojik cevabı etkilediği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [52,53].

Endotoksin sinyal yolunun ilk basamaklarında görev alan CD14 (C159T) ve TLR4 (A896G ve C1196T) genlerindeki genetik değişikliklerin astım ve atopi ile ilişkisi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [54, 55]. 2005 senesinde Hacettepe Üniversitesi Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi Laboratuvarları çalışmada, CD14 geni promotor bölgede yer alan C159T değişikliğinin, kodominant modelde üç genotip (CC, CT, TT) arasında, atopik astımlı çocuklarda total IgE düzeylerinin farklı olduğunu ve TT genotipinin düşük IgE düzeyi ile anlamlı olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Endotoksin sinyal yolu (from Wikipedia)

Bununla birlikte atopiye sahip hafif astımlı grupta, TLR4 (A896G ve C1196T) polimorfizmlerinin daha yüksek sıklıkta olduğu da bulunmuştur [56]. IgE düzeyleri arasında gözlenen bu farkın hücresel temelini ortaya koymak amacıyla farklı genotiplere sahip bireylerin periferel kan mononükleer hücre (PBMC) kültüründe, uyarılmamış koşulda CC genotipini taşıyan çocukların, TT genotipi taşıyan çocuklara göre daha yüksek miktarda solubl CD14 taşıdığını *in vitro* koşullarda gösterilmiştir [56]. Endotoksin (100ng/ml) ile uyarılma sonucunda TT genotipini taşıyan bireylerde IL-10 ve IL-1 β seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulunmuş [57] ve başka bir çalışmada PBMC'lerde IgE sentezi ve sitokin üretimi üzerine CD14, C159T polimorfizminin etkileri gösterilmiştir. PBMC hücrelerinin 2 ve 200 ng/ml LPS ile uyarılması sonucunda TT genotipi, yüksek IgE sentezi ve germline transkripsiyonu ile ilişkili bulunmuştur. Buna karşın genotip farklılıkları ile IgM ve IgG düzeyleri arasında bir fark bulunamamıştır. Bunun yanı sıra, kültür süpernatanında artmış IL-4/IL-12 ve IL-4/INF- γ oranlarını TT genotipi ile ilişkisinin anlamlı olduğu bulunmuştur. Endotoksin ile uyarılmanın CD14 promotor bölgede yer alan C159T polimorfizminin IgE cevabına etkisinin *in vivo* (hasta plazma) ve *in vitro* (hücre kültürü süpernatan) koşullarda farklı olduğu gösterilmiştir. *In vivo*'da C allelinin yüksek IgE için risk faktörü, *in vitro*'da ise T allelinin yüksek IgE için risk faktörü olabileceği görülmüştür. Yaptığımız çalışmaların sonuçlarına göre, *in vivo*

ve *in vitro* koşullar arasında gözlenen farkın, gen – çevre etkileşimi ve maruz kalınan endotoksin (LPS) miktarına bağlı olabileceği yorumuna gidilmiştir [58].

CD14 genotip varyantlarında IgE sentezinde gözlenen farklılıklar, endotoksin sinyal yolunda yer alan diğer moleküllerin genotip farklılıklarının da IgE düzeyi üzerine etkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu sorunun cevabını bulmak için endotoksin sinyal yolundaki major moleküller belirlenerek bu moleküllerde bulunan ve minör allel frekansı %10'nun üzerinde olan tek nükleotid değişiklikleri (SNP) saptanmıştır [55]. Farklı moleküldeki 81 SNP daha önce CD14 genotipi belirlenmiş TT ve CC genotipine göre *in vitro* IgE düzeyleri bilinen 45 hastada araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda IgE düzeyi ile CD14, TLR4, IRF3, IRF5 ve TRAF6 genleri arasında ilişki bulunmuştur. IRF3 geninde yer alan rs7251, rs2304204 ve rs2304205 SNP'lerinin IgE düzeyi ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir [59].

Endotoksin sinyal yolunda görev yer alan moleküllerdeki genetik farklılıkların, astım ve astım fenotipleri ile ilişkisini araştırmak üzere Hacettepe Üniversitesi Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi Laboratuvarları yaptığı çalışmada; IRF3, MAPK8 ve CD14 genleri astım ve astım fenotipi ile ilişkili bulunmuştur. Yine bu çalışmanın sonucuna göre ilk defa IRF3 genindeki tek nükleotid değişikliğinin (rs7251) astım ve astım fenotipi ile ilişkili olabileceği de gösterilmiştir [59].

Literatür bilgileri tarandığında IRF3 genindeki genetik değişikliklerin astım, astım fenotipleri ve IgE sentezi üzerine etkisine dair Hacettepe Üniversitesi Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi Laboratuvarları çalışması dışında bir veriye rastlanmamıştır [59]. IRF3 molekülündeki genetik değişikliklerin astım ile ilişkisini ortaya koymak bu nedenle son derece önemlidir. IRF3 molekülü ileriki çalışmalar ile astım tanı ve tedavisinde hedef molekül olmaya iyi bir aday gen potansiyeline sahiptir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması

Tez çalışması kapsamında incelenen 525 astımlı hasta ve 225 kontrol grubuna ait genomik DNA örnekleri Hacettepe Üniversitesi Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi Laboratuvarları, DNA bankasından temin edildi. Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerin her birinden etik kurallar çerçevesinde, kan örneği toplanmıştır. Bu DNA örneklerinin çalışmamızda kullanılabilmesi için tekrar Hacettepe Üniversitesi Etik Kuruluna başvurulmuş ve yeni etik kurul izni alınmıştır.

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), herhangi bir organizmadan izole edilmiş DNA kullanılarak dizisi bilinen özgül bölgelerin uygun primerler yardımıyla çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit bir *in vitro* DNA sentez yöntemidir. Günümüzde PZR yöntemi, mutasyonların tanımlanması, adli tıbbı ilişkin DNA parmak izi analizleri, allelik dizi değişimlerinin tanımlanması, gen ifadesinin belirlenmesi ve kantitasyonu, bakteriyel ve viral enfeksiyonların taranması, prenatal tanı, filogenetik çalışmalar, ancient DNA (aDNA) analizleri ve gen dizi analiz çalışmalarında çok kullanılan bir yöntem haline gelmiştir.

PZR tekniğinin çalışma prensibi birbirini tekrarlayan üç basamağa dayanmaktadır:

1. Denatürasyon Basamağı (denaturation): Yüksek sıcaklıkta (90-95 °C) DNA çift zincirinin ayrılması sağlanır.
2. Birleşme Basamağı (annealing): Primerlerin uygun bir sıcaklıkta (50-70 °C) tek zincirli hale getirilmiş DNA kalıbına bağlanması sağlanır. Primerler 18-22 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotitlerdir ve çoğaltılacak DNA bölgesinin uçlarındaki tanımlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır.
3. Zincir Uzama Basamağı (extension): Optimum çalışma sıcaklığında (70-75 °C) polimeraz enzimi, ortamdaki serbest nükleotitleri kalıp DNA'ya komplementer olacak şekilde, primerin 5'ucundan 3'ucuna doğru ekleyerek zincirin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.

Bu üç basamaktan oluşan bir reaksiyon seti bir döngü olarak ifade edilir. Yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde

kalıp görevi görürler. Bir döngü yaklaşık 2-5 dakika sürer ve pek çok kez tekrarlanır. Döngü sayısını “n” kabul edersek, PZR sonucu tüp içerisinde bulunan DNA miktarı “2ⁿ” olarak ifade edilir. Reaksiyon özgülüğünü doğru şekilde tasarlanmış primer oligonükleotidlerin seçilmesiyle sağlanır. Primerler, çoğaltılacak DNA bölgelerine bağlanacak olan, bağlanma bölgesine komplementer yapıda, kısa, tek zincirli, sentetik DNA molekülleridir.

PZR tekniğinde ısıya dayanıklı bir bakteri olan *Thermus aquaticus*’tan izole edilen Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır. Taq DNA polimeraz enzimi 85kDa molekül ağırlığında olup, 72 °C’de optimum polimerizasyon aktivitesini gösterir. Polimeraz enzimleri aktivite için serbest magnezyum iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Başarılı bir amplifikasyon için optimum magnezyum derişiminin bilinmesi gerekir. Her dNTP’den 0,2 mM kullanıldığında optimum magnezyum derişimi 1,5-4 mM arasındadır. Bu çalışmada, PZR ‘ler ve kullanılan reaksiyon karışımı Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR reaksiyon karışımı

DNA	2 µl
10x Reaksiyon tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
2,5 mM dNTP karışımı	1 µl
İleri primer-F (10 pmol/µl)	1 µl
Geri primer-R (10 pmol/µl)	1 µl
sd H ₂ O	15,9 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,1 µl
Toplam Hacim	25 µl

3.2.1. IRF3 Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

Bu çalışmada ilk 25 astım hastalarından ve 25 kontrol bireylerde genomik DNA’lardan IRF3 genine ait uzak promotor, yakın promotor, ekzon1, ekzon 2, ekzon 3, ekzon 4, ekzon 5, ekzon 6, ekzon 7, ekzon 8 (ekzon-intron bağlantı bölgeleri dahil) ve 600 baza kadar 3’UTR bölgeleri uygun primer setleri sentezlenerek PZR ile çoğaltıldı. İlgili gen bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerlere ait diziler, Çizelge 3.2’de, PZR koşulları ve PZR ürün büyüklükleri Çizelge 3.3’de verilmiş ve primerler Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. IRF3 genin en ilgili gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin dizisi

Uzak promotor	F 5' GCAGTCTCTTTCCCCAACT 3'
	R 5' GGAACCTACACCTCACAGCAG 3'
Yakın promotor	F 5' CTATAAGAGGCATATGCCAAAC 3'
	R 5' ATCATTCTTTGGGTAACAGACC 3'
Ekzon 1	F 5' CAGCGTAGAAAGGGCGGAAC 3'
	R 5' CACCCCTCCCTCTCTAGAAC 3'
Ekzon 2	F 5' CTGTAGGGGGACTGTGGAAG 3'
	R 5' TAGGAGTCCTTTCCGCCAG 3'
Ekzon 3,4	F 5' ACTAGAGGTGGGGGATGGAG 3'
	R 5' GGGATCGTCTAGAGGGAGAG 3'
Ekzon 5,6	F 5' CTGCGTTGCTGAGAACAGAC 3'
	R 5' GAACTTGTCATCTGCCACC 3'
Ekzon 7	F 5' TTAGGTCAGGGGAGGTGGTG 3'
	R 5' GGAGTTGGAGTTCCTGGGAG 3'
Ekzon 8	F 5' TTCATCCTAGGTTACAGCAGG 3'
	R 5' GCTTGGTCTTCATGCATTGAG 3'
3'UTR	F 5' TTGTTATTCCCGCTCAGGGTC 3'
	R 5' TCCCCATTGAGTTGGCTTCTC 3'
Bfa I restriksiyon endonükleaz enziminin kesimi için	F 5' AGCCTCGAGTTTGAGAGCTAC 3'
	R 5' CTAGTTTTTCTGCAGCCGACC 3'

10x Reaksiyon tamponu: 10 mM Tris HCL Ph = 9,0; 50 mM KCL, %0,1 % Triton X 100, 0,2 mg/ml BSA veya jelatin.

Hazırlanan örnekler DNA çift zincirinin açılması (denatürasyonu), olası proteaz kontaminasyonunun önlenmesi ve ekzonükleaz aktivitesinin ortadan kalkması için PZR programı başlamadan önce, örnekler 94 °C'de 2 dakika bekletilmiştir. En son döngüden sonra yarım kalan reaksiyonların tamamlanması için 72 °C'de 5 dakika polimerizasyon sağlandı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. IRF3-004 genin nen ilgili gen bölgelerinin PZR koşulları ve PZR ürün büyüklükleri

IRF3 Gen Bölgeleri	PZR koşulları	PZR ürününün büyüklüğü (bp)
Uzak promotor	94°C/2'(94°C/45s, 60°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5' / 33 döngü	766
Yakın promotor	94°C/2'(94°C/45s, 62°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5' / 31 döngü	661
Ekzon 1	94°C/2'(94°C/45s, 60°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5' / 31 döngü	550
Ekzon 2	94°C/2'(94°C/45s, 58°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5' / 33 döngü	661
Ekzon 3,4	94°C/2'(94°C/45s, 62°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5' / 31 döngü	582
Ekzon 5,6	94°C/2'(94°C/45s, 60°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5' / 33 döngü	897
Ekzon 7	94°C/2'(94°C/45s, 60°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5' / 31 döngü	295
Ekzon 8	94°C/2'(94°C/45s, 60°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5' / 33 döngü	492
3'UTR	94°C/2'(94°C/45s, 60°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5' / 31 döngü	600
Bfa I restriksiyon endonükleaz enziminin kesimi için	94°C/2'(94°C/45s, 58°C/45s, 72°C/1'30s) 72°C/5'/31 döngü	248

IRF3 PROF1

TGCAACGCAGTCTCTTTCCCCAACTCCCTCCCTCCCCCGCTGAGGACCTCTCTCCAAAACCCCAAAGACA
GAGAATAGAGCCAGATATAAAGAGAGGAGACAGACTGAGACCAGGAGCAAGAGTTAGGAGGGAGCCTCA
AATGCTGGCCCCGTGGGGGAGAAGGCCACTCCTCTTACCTAGGTGGAGTTGGAACAGGAGACCCGGCAG
CCTCACCCAGCCTAAGGAAGGCAGCTAGGACCCCTCAGCGTGTCTTCCGGAGCCCCAGCTCTTCAGAGC
CTGCCATGGAGGCACCTGTGTAGAGAGAGGGTTAGGACTGGACTCCAAGGGTTTAGCAAGAAGTGAGG
CTTGGGGACCAGACCTTGTGAGTCCCAAGGAAGGTGCTGAGGGCCTGGACTCCTGGGTCTTTGGAGAG
TGTGGGTCTGGGGGCCTAGACTCTTGAGTCTCAGACGAAAAGCGATCAGGAAAAGACTCTTCGATC
CAAGGAAAGGTGTGGGGCTGGGTGCCCAGATTCTGGGTCTAAAGGAGGAGGGAGCTGGGGTCTTGGA
CTTCTGAGTCTTAGAGAAAAAGGAACTGGAGCCCCAGACCTTAGGTCTCCAGGAAGAAGAGGCTTAG
CGCCCCACTCCTGGATTCTATAAGAGGCATATGCCAAACTCTCTGAAACCCCTTAAGACCTCGGGAAC
CCAATCCCAAGAGGGTTTCAGGGCAAATCTTCCCTAGTTCGCGCTTCTTCGCGCGCAGCTGTGCTGTG
AGGTGTAGTTCCAAATCTCCGACCCCTGTGGAATCTAGAGGACCCCTGGACCCCTGGATATCAGAGAA

Promotor
ve 5'UTR

IRF3 PROR1

IRF3 PROF2

TCTCCAGGAAGAAGAGGCTTAGCGCCCCAACTCCTGGATTCTATAAGAGGCATATGCCAAACTCTCTGAAACCCCTTAA
AGCATCGGGAAC TACCAATCCCAAGAGTTTCAGGGCAAATCTTCCCCTAGGTCGCGCTTCTTCGCCGCGCAGCCTG
CTGTGAGGTGTAGTTTCCAAATGCTCCGACCCCTGCTGGAATCTAGAGGCCCTGGACCCCTTGGATATCAGAGAAGCGGT
ACTGGGTGCGCCACCACCTGATCCGCCCCCTCCTCTCCCTCCTCACCACCCTCGTCAACACCCTGTCAGCT
GGTCCGGGGGCCCAACGCGCGCTCCTCCACTCAACTTCCGGTCTCCTCCACTGAACCTGTACAACTTTATTAGTTCA
ACTTTCCGCGCCTGCGCACTGGGCCGGGTCGATAACCGGCCAGCGTAGAAAGGGCGGAACGCTGGGTGCACGCTCA
ATTTGCACTGTGACGCTCCAGACTGCTCTGGCCGGAAACCCAAAAAGGGCATAGGGGCGGGAACAGCCAGCGGGC
CGTCCCATCGGCTTTTGGGCTGTGTTACCAAGAATGATAAGTGTGTTTTATTTCAGAAGTCGATCAAAAAGAAAG
CCCCAGCG

IRF3 PR02

- Ekzon 1

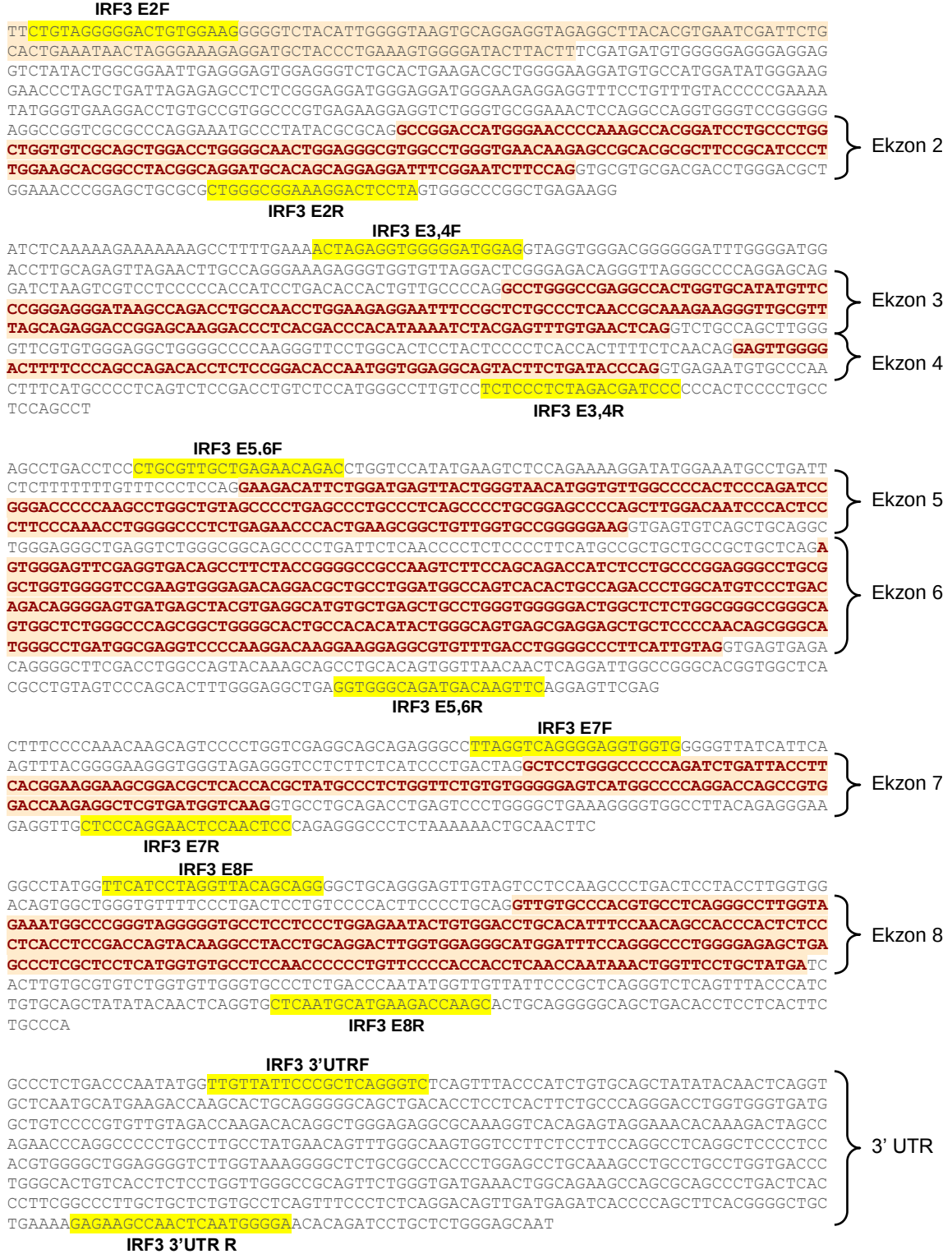
IRF3 PROR2

IRF3 E1F

CCGGGTGTCGATAACCGGCC **CAGCGTAGAAAGGCGCGAA**CGCTGGGTGCACGCTCAATTTCATGTGTACGCTCCACGACAT
GCCTCTGCGCC **GGAAACCCAAAAAGGGC**ATAGGGCGGGAAACAGCCCAGCGGGCGCTCCATCGGCTTTTGGGTCTGT
TACCCAAAGAATGATAAAAGTTGGTTTATTTCAGAAAGTCGATCAAAAAAGACGCCAGCGCTCTAGAGCTCAGCTG
ACGGGAAAGGGGTGCAGCAGCTCGAGTTTGAGAGCTACCCGGAGCTCAAGACAGGGGTGGGTTCCAGTCTGCCGCA
CGCCCCGACCTTCCATCGTAGGTAACGCGGAAGAGCCCGGGAGAGCGTTGGTGGCGTCCGAGAGCGAGGAGCGGGAAA
GAGGATGGGTTCTGCACGGAGATGGAAAGGCAGGCTGTGTACTCTGGGGAAAGTGGAGCAAGGAAGGAGCTACAGTGG
CCGACGCTGGAGTCGGCTGCAGAAAACTAGAAAAAGTAGGGAGGAAAGAGGAAAAGAGGAGGCGTCTACACTGAGG
GG**TTCTAGAGAGGGGAGGGGGT**GACTCCGTAGTAGGGGGTAGTTTCAGTCTCG

- Ekzon 1

IRF3 E1R



Şekil 3.1. IRF3 gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi (Primerler sarı renk ile gölgelendirilmiştir.)

PZR sonucunda elde edilen amplifikasyon örnekleri, %1'lik agaroz jelde incelenmiştir.

3.3. Otomatik DNA Dizi Analizi

Zincir sonlandırma metodu ile DNA dizi analizi reaksiyonunda, özgül primerlerin bağlandığı tek zincirli DNA kalıpları kullanılır. Sentez reaksiyonunun durması, zincire DNA uzamasını engelleyecek nükleotit analoglarının katılması ile gerçekleştirilir. Bu zincir sonlandırıcılar, DNA zincir uzamasını sağlayan serbest 3'-OH grupları bulunmayan 2',3'- dideoksinükleozit-5'-trifosfatlardır (ddNTP). dNTP'ler ve dört farklı ddNTP'nin birinden oluşan karışım kullanıldığı zaman, enzim tarafından katalize edilen reaksiyon, ddNTP'nin yapıya katıldığı noktada duracaktır. Bütün bir dizilim, her birinde ayrı bir ddNTP'nin bulunduğu dört ayrı reaksiyon sonucunda elde edilir. Dizi reaksiyonları, EDTA ve formamid ile sonlandırılır, ısıtılarak denatüre edilir.

DNA dizi analizi, Sanger yönteminde kullanılan ddNTP'lerin her bir çeşidinin farklı renkteki bir floresan etiketle işaretlenmesi yolu ile otomatikleştirilmiştir. Bu yöntemde, birbirinden farklı renklerde işaretlenen ddNTP'lerin dördü de aynı reaksiyon tüpüne konulur. Reaksiyon sonucunda oluşan renkli DNA fragmentleri, kapiller tüp içine doldurulan polimerde ayrıştırılır. Yürüme sonucunda ortaya çıkan renkli pikler, lazer okuyucu tarafından saptanarak bilgisayara aktarılır.

DNA dizi analizi için Floresan işaretli ddNTP'ler yardımıyla tek zincirli DNA sentezi sırasında DNA'da yer alan nükleotitler farklı floresan boya ile işaretlenmiştir. İşaretli ürünler kapillere uygulanmış ve örneklerin DNA dizisi kromatogram analizi yapan programlar (chromas lite) aracılığıyla bilgisayarda kontrol edilmiştir.

3.3.1. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

DNA dizi analizi uygulanacak amplifikasyon ürünlerin temizlenmesi, PZR sonunda oluşacak özgül olmayan bant kirliliğinin önlenmesinde önemlidir. Bu nedenle reaksiyon öncesi tüm ürünlerin temizlenmesi gerekmektedir. PZR artıklarından temizlenmesi Exonuclease I / Shrimp Alkaline Phosphatase kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Her bir PZR ürününün temizlenmesi için aşağıdaki karışım hazırlanmıştır:

PZR ürünü	4 µl
Exonuclease 1 (10 Ünite/µl)	1 µl
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 Ünite/µl)	1 µl
Toplam Hacim	6 µl

Tüp içerikleri pipetlenerek karıştırılmış ve ısı döngüleyiciye yerleştirilerek aşağıda program uygulanmıştır:

37 °C	20 dakika
80 °C	20 dakika
95°C	2 dakika

3.3.2. Otomatik DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi)

Otomatik DNA dizi analizi reaksiyonu, “ABI PRISM Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit” kullanarak ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıda verildiği şekilde yapılmıştır

Döngüler tamamlandıktan sonra reaksiyondan artan malzemeler, aşağıda belirtilen prosedür takip edilerek ortamdan temizlenmiştir.

1. Her bir tüpe 2 µl 3M sodyum asetat ilave edilmiştir.
2. Tüplere 50 µl soğuk %95-100'lük etil alkol ilave edilmiş ve iyice karıştırılarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
3. Tüpler 15 dakika -20 °C'de bekletilmiştir.
4. 20 dakika 13000 rpm'de santrifüje edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
5. 250 µl soğuk %70'lik etil alkol ilave edilmiştir.
6. 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
7. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet 56 °C ısısında 5-6 dakika kurumaya bırakılmıştır.
8. Pelet 20 µl formamid ilave edilerek çözülmüş ve vortekslenmiştir.
9. Örnekler kapiller elektroforez sisteminin tüplerine aktarılmıştır.

10. Örnekler 95 °C'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiştir.
11. 5 dakika - 20°C'de bekletilmiştir.
12. Hazırlanan örnekler kapiller elektroforez sisteminde yürütülmüştür.

3.4. IRF3 Genotiplenme Metodu

3.4.1. PZR-RFLP [Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)]

Restriksiyon enzimleri (RE) DNA dizisinde özgül bölgeleri tanıyıp kesen proteinlerdir. DNA diziliminde meydana gelecek değişiklikler RE tanıma dizilerini etkileyerek, enzimin kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni kesim noktası oluşmasına neden olabilir.

DNA dizi analizi sonucunda IRF3 geninin 1. İntronunda rs34739574 (CTG[G/A]GTG motifi) ve 5'UTR bölgesinde rs139412285 bulunan tek nükleotit değişikliklerin (TTC[A/G]AGC motifi) (snp data box. www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) astımlı ve sağlıklı bireylerde sıklığını belirlemek için PZR-RFLP [Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)] yöntemi kullanıldı.

astımlı ve sağlıklı bireylere ait DNA örnekleri IRF3 genine özgü primerleri kullanarak çoğaltıldı ve Dde I $\left\{ \begin{array}{l} 5'....c/tnag.. 3' \\ 3'....gant/c.. 5' \end{array} \right\}$ ve Bfa I $\left\{ \begin{array}{l} 5'....c/tag.. 3' \\ 3'....gat/c.. 5' \end{array} \right\}$

restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildiler

IRF3 geninin 1. İntron bölgesinin rs34739574 polimorfizmin genotiplenmesinde kullanılan ileri ve ters primerler mavi ile belirtilmiştir. Dde I restriksiyon endonükleaz enziminin tanıma gölgesi sarı ile belirtilmiştir ve geninin ekzon 2 bölgesi kırmızı ile belirtilmiştir (<http://www.ensembl.org>). (Şekil 3.2)

IRF3 geninin 5'UTR bölgesinin rs139412285 (C/T) polimorfizmin genotiplenmesinde kullanılan ileri ve ters primerler yeşil ile belirtilmiştir. Bfa I restriksiyon endonükleaz enziminin tanıma gölgesi sarı ile belirtilmiştir ve geninin ekzon 1 bölgesi kırmızı ile betimlenmiştir (<http://www.ensembl.org>). (Şekil 3.3).

>chromosome: GRCh37:19:50162229:50170632:-1

IRF3 F2
TTCTGTAGGGGGACTGTGGAAGGGGGTCTACATTGGGGTAAGTGCAGGAGGTAGAGGCTTACACGTGAAT
CGATTCTGCACTGAAATAACTAGGGAAAGAGGATGCTACCCCTGAAAGTGGGGATACTTACTTTCGATGAT
GTGGGGGAGGGAGGAGGTCTATACTGGCGGAATTGAGGGAGTGGAGGGTCTGCACTGAAGACGCTGGGGA
AGGATGTGCCATGGATATGGGAAGGAACCTAGCTGATTAGAGAGCCTCTCGGGAGGATGGGAGGATGGG
AAGAGGAGGTTTCTGTGTTGTACCCCGAAAATATGGGTGAAGGACCTGTGCCGTGGCCCGTGAGAAGGA
GGTCTGGGTGCGGAAACTCCAGGCCAGGTGGGTCCGGGGAGGCCGGTTCGCCCCAGGAAATGCC
Dde I Restriksiyon Endonükleaz Tanıma Bölgesi
CTATACGCGCAGGCCGGACCATGGGAACCCCAAAGCCACGGATCCTGCCCTGGCTGGTGTGCGAGCTGGA
CCTGGGGCAACTGGAGGGCGTGGCCTGGGTGAACAAGAGCCGACGCGCTTCGCATCCCTTGGGAAGCAC
GGCCTACGGCAGGATGCACAGCAGGAGGATTTGCGAATCTTCCAGGTGCGTGCACGACCTGGGAGCGTG
GAAACCCGGAGCTGCGCGCTGGGGCGAAAGGACTCCTAGTGGGCCCGGCTGAGAAGG
IRF3 R2

Şekil 3.2. IRF3 geninin rs34739574 polimorfizmin genotiplenmesinde kullanılan primerler ve Dde I enziminin tanıma bölgesi

>chromosome: GRCh37:19:50162229:50170632:-

CCGGGTGCGATAACCGGCCAGCGTAGAAAGGGCGGAACGCTGGGTGCACGCTCAATTTGCATGTGACGCT
CCCAGCATGCCTCTGGCCGGAAACCCAAAAAGGGCATAGGGGCGGGAACAGCCAGCGGGCCGTCCCAT
CGGCTTTTGGGTCTGTTACCCAAAGAATGATAAGTTGGTTTATTTCAGAAGTCGATCAAAAAGAAAG
CCCCAGCGCTCTAGAGCTCAGCTGACGGGAAAGGGGTGCGCAGCCTCGAGTTTCAGAGCTACCCGGAGC
TCCAAGACAGGGGTGGGTTCAGCTGCCCCGACGCCCCGACCTTCCATCGTA IRF3 F(Bfa I)
Bfa I Restriksiyon Endonükleaz Tanıma Bölgesi
GGTAACGCGGAAGAGCCCGGAGAGCGTTGGTGGCGTCCGAGAGCGAGGAGCGGGAAAGAGGATGGGTCT
GCACGGAGAGTGGAAAGGCAGGCTGTGTACTCTGGGGAAAGTGGAGCAAGGAAGGAGCTACAGTGGCCGA
CGCTGGAGTGGCGCTGAGAAAGCTAAAAAAAGTAGGGAGGAAAGAGGAAAGAGGAGGCGTCTACACT
GAGGGGGTTCTAGAGAGGGAGGGGTGGACTCCGTAGATGGGGGTAGTTTCAGTCTCG
IRF3 R(Bfa I)

Şekil 3.3. IRF3 geninin rs139412285 polimorfizmin genotiplenmesinde kullanılan primerler ve Bfa I enziminin tanıma bölgesi

3.4.2. RFLP İçin Örneklerin Hazırlanması

Amplifikasyon ürünleri Dde I enzim ile kesim reaksiyonu için belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Amplifikasyon ürünü	8 µl
RE Dde I	1 µl
10X Buffer R ⁺	2,5 µl
dH ₂ O	10,5 µl
Toplam hacim	25 µl

Reaksiyon karışımı 37 °C'ye ayarlı etüvde 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde 6X durdurma tamponundan (%40 sukroz, %0,25 brom fenol mavisi, %60 10XTBE tamponu) her reaksiyon tüpüne 2 µl eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. *Bsu R I* RE kesimi sonucunda elde edilen ürünler %2'lik agaroz jele yüklenerek jel elektroforezleri yapılmıştır.

Amplifikasyon ürünleri Bfa I enzim ile kesim reaksiyonu için belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

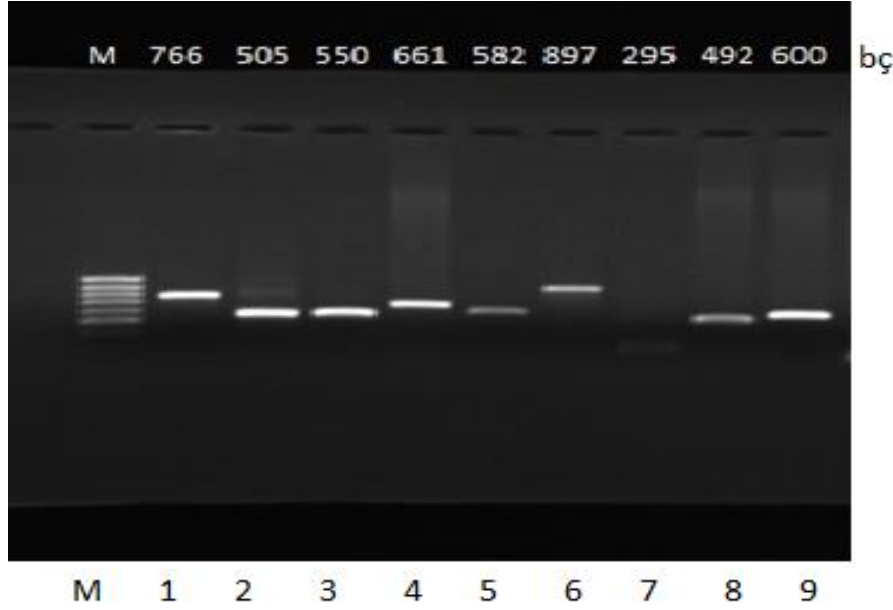
Amplifikasyon ürünü	7 µl
RE Bfa I	0,8 µl
10X Buffer R ⁺	2,5 µl
dH ₂ O	14,7 µl
Toplam hacim	25 µl

Reaksiyon karışımı 37 °C'ye ayarlı etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde 6X durdurma tamponundan (%40 sukroz, %0,25 brom fenol mavisi, %60 10XTBE tamponu) her reaksiyon tüpüne 2 µl eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. *Bsu R I* RE kesimi sonucunda elde edilen ürünler %2,5'lik agaroz jele yüklenerek jel elektroforezleri yapılmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. IRF3 Geni PZR Sonuçları

25 astımlı ve 25 kontrol bireylerde yapılan IRF3 geninin uygun primer setleri ile yapılan promotor (uzak ve yakın), 8 ekzon 'nu (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) ve 3'UTR bölgelerinin PZR görüntülerine ait bir örnek şekil 10 da görülmektedir.



Şekil 4.1. IRF3 genin promotor (uzak ve yakın), 8 ekzon ve 3'UTR bölgelerin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi (Marker,1. uzak promotor, 2. yakın promotor, 3. Ekzon 1, 4. Ekzon 2, 5. Ekzon 3 ve 4, 6. Ekzon 5 ve 6, 7. Ekzon 7, 8. Ekzon 8 ve 9. 3'UTR)

4.2. Otomatik DNA Dizi Analizi

25 astımlı ve 25 kontrol bireylerde IRF3 geninin uzak promotor bölgesini içine alacak şekilde 766 baza kadar, yakın promotor bölgesini içine alacak şekilde 505 baza kadar, geninin Ekzon 1 bölgesini içine alacak şekilde 550 baza kadar, geninin Ekzon 2 bölgesini içine alacak şekilde 661 baza kadar, Ekzon 3,4 bölgesini içine alacak şekilde 582 baza kadar ve geninin Ekzon 5, 6 bölgesini içine alacak şekilde 897 baza kadar, Ekzon 7 bölgesini içine alacak şekilde 295 baza kadar, Ekzon 8 bölgesini içine alacak şekilde 492 baza ve 3'UTR bölgesini içine alacak şekilde 600 baza kadar olan PZR ürünleri DNA dizi analiz yöntemi ile tarandı. DNA dizi analizi sonucunda genin 5'UTR bölgesinde rs2304204 rs2304205, rs3204440 ve rs139412285 polimorfizmleri, 1. intronunda rs2304206

ve rs34739574 polimorfizmleri ve 8. ekzonunda rs7251 polimorfizmi bulunmuştur (snp databox. www.ncbi.nlm.nih.gov/snp).

Bulunan tüm polimorfizmler ve polimorfizmlerin baz değişimleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. IRF3 genin promotor (uzak ve yakın), 8 ekzon ‘nu (1, 2, 3_4, 5_6, 7, 8) ve 3’UTR bölgelerinde bulunan polimorfizmler

Polimorfizmler ve bulunduğu gen bölgeleri	Polimorfizmlerin üzerinde yer aldığı dizilim
rs2304204 5'UTR	GAAGTCGATC[A/G]AAAAGAAAG
rs3204440 5'UTR	TACCCGGAGC[T/C]CCAAGACAG
rs2304205 5'UTR	AAGACAGGGG[T/G]GGGTTCCAGC
rs139412285 5'UTR	GGGTGGGTTC[C/T]AGCTGCCCCG
rs2304206 1. intron	CGGAAGAGCC[C/T]GGGAGAGCGTT
rs34739574 1. intron	AGGGGTCTGG[G/A]GTGCGGAAACT
rs7251 Ekzon 8	CCTGGGGAGA[G/C]CTGAGCCCT

IRF3 geninin promotor (uzak ve yakın), 8 ekzon ‘nu (1, 2, 3_4, 5_6, 7, 8) ve 3’UTR bölgelerin de DNA dizi analizi sonucunda toplam yedi adet tek nükleotit değişikliği bulunmuştur. Bulunan bu değişiklikler; sırasıyla motif yapılarıyla birlikte rs2304204-ATC[A/G]AAA Şekil 4.2’de, rs3204440-AGC[T/C]CCA Şekil 4.3’de, rs2304205-GGG[T/G]GGG Şekil 4.4’de, rs139412285-TTC[C/T]AGC Şekil 4.5’de, rs2304206-GCC[C/T]GGG Şekil 4.6’da, rs34739574TGG[G/A]GTG Şekil 4.7’de, rs7251- AGA[G/C]CTG Şekil 4.8’de görülmektedir.

Polimorfizm rs2304204 (IRF3 - 5'UTR)

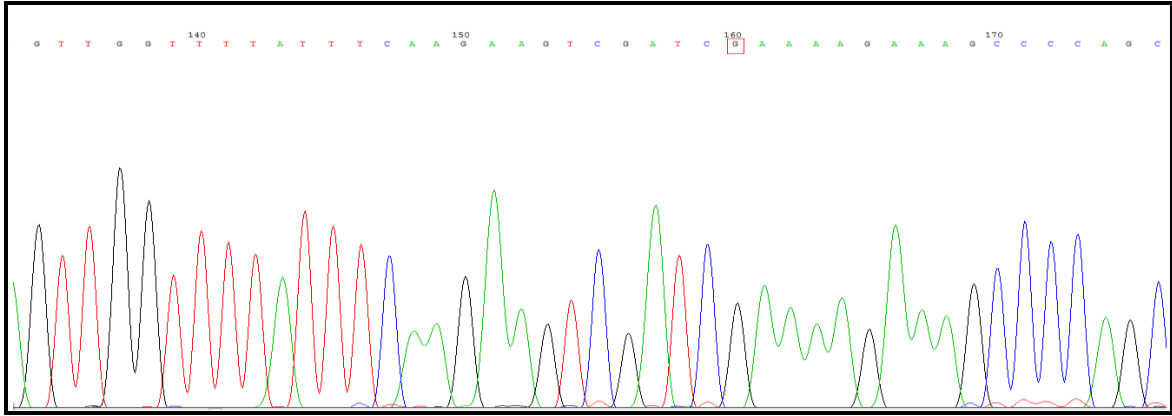
GAAGTCGATC[A/G]AAAAGAAAG

A → G

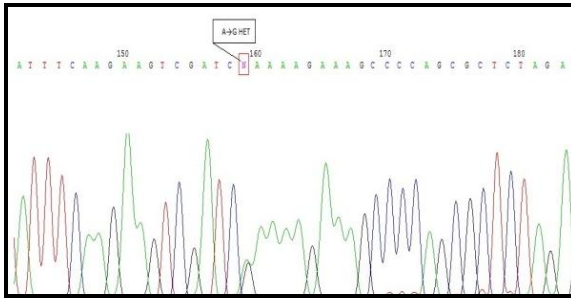
CCCCACCCCTCGTCAACACCCCGCTGACCTGGTCCGGGGCCCCACCGCGCCTCCTCCACTC
AACTTGCGGTCTCCTCCACTGAACTCGTACAACTTTATTAGTTCAACTTTCCCGCGCCTGC
GCACTGGGCGGGGTCGATAACCGGCCAGCGTAGAAAGGGCGGAACGCTGGGTGCACGCTCA
ATTTGCATGTGACGCTCCAGCATGCCTCTGCGCGGAAACCCAAAAAGGGCATAGGGGCGG
GAACAGCCCAGCGGGCCGTCCCATCCGCTTTTGGGTCTGTTACCCAAAGAATGATAAAGTTG
GTTTTATTTCAAGAAGTCGATCAAAAAGAAAGCCCCAGCGCTCTAGAGCTCAGCTGACGGGA
AAGGGGGTGCAGCAGCTCGAGTTTGAGAGCTACCCGGAGCTCCAAGACAGGGGTGGGTTCGA
GCTGCCCGCACGCCCCGACCTTCCATCGTAGGTAACGCGGAAGAGCCCGGGAGAGCGTTGGT
GGCGTCCGAGAGCGAGGAGCGGGAAAGAGGATGGGTCTGCACGGAGAGTGGAAAGGCAGGCT
GTGTACTCTGGGGAAGTGAGCAAGGAAGGAGCTACAGTGGCCGACGCTGGAGGTCGGCTG
CAGAAAACTAGAAAAAGTAGGGAGGAAAGAGGAAAAAGAGGAGGCGTCTACACTGAGGGGGT
TCTAGAGAGGGAGGGGTGGACTCCGTAGATGGGGGTAGTTTCACTCTCGAAACCTGGGGCGTG
CTCTGTCTTGAGAGAGGAGGCGGGCAGTCGGAGGGGAATTGAATG

Ekzon 1

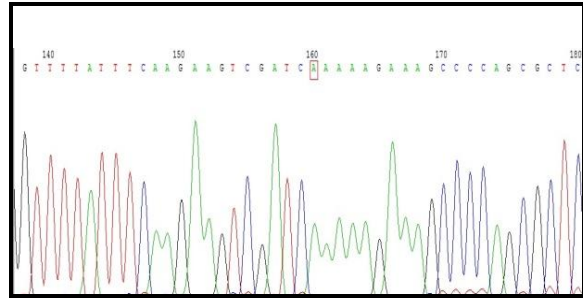
GG



AG



AA



Şekil 4.2. IRF3 geni 5'UTR bölgesinde bulunan polimorfizm rs2304204

Polimorfizm rs3204440 (IRF3 - 5'UTR)

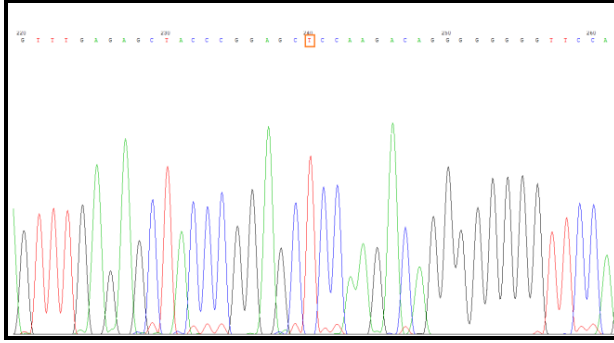
TACCCGGAGC[T/C]CCAAGACAG

T → C

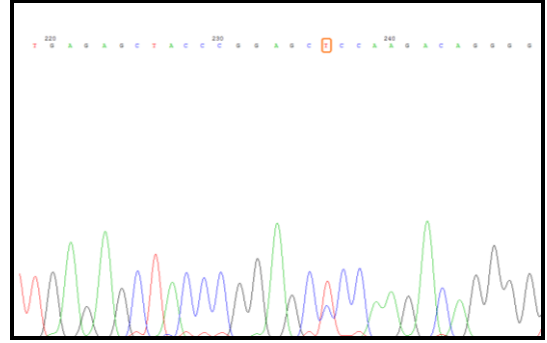
CCCCACCCCTCGTCAACACCCCGCTGACCTGGTCCGGGGCCCCACCGCCGCCTCCTCCACTC
AACTTGCGGTCTCCTCCACTGAACTCGTACAACTTTATTAGTTCAACTTTCCCGCGCCTGC
GCACTGGGCGCGGTTCGATAACCGGCCAGCGTAGAAAGGGCGGAACGCTGGGTGCACGCTCA
ATTTGCATGTGACGCTCCAGCATGCCTCTGGCCGGAAACCCAAAAAGGGCATAGGGGCGG
GAACAGCCCAGCGGGCCGTCCCATCGGCTTTTGGGTCTGTTACCCAAAGAATGATAAAGTTG
GTTTTATTTCAAGAAAGTCGATCAAAAAGAAAGCCCCAGCGCTCTAGAGCTCAGCTGACGGGA
AAGGGGGTGCAGCAGCTCGAGTTTGAGAGCTACCCGGAGCTCCAAGACAGGGGTGGGTTCGA
GCTGCCCCGACGCCCCGACCTTCCATCGTAGGTAACGCGGAAGAGCCCGGGAGAGCGTTGGT
GGCGTCCGAGAGCGAGGAGCGGGAAAAGAGGATGGGTCTGCACGGAGAGTGGAAAGGCAGGCT
GTGTACTCTGGGGAAAGTGGAGCAAGGAAGGAGCTACAGTGGCCGACGCTGGAGGTCTGGCTG
CAGAAAAACTAGAAAAAGTAGGGAGGAAAAGAGGAAAAGAGGAGGCGTCTACACTGAGGGGGT
TCTAGAGAGGGAGGGGTGGACTCCGTAGATGGGGGTAGTTTCACTCTCGAAACCTGGGGCGTG
CTCTGTCTTGAGGAGGGAGGCGGGCAGTCGGAGGGGAATTGAATG

Ekzon 1

TT



TC



Şekil 4.3. IRF3 geni 5'UTR bölgesinde bulunan polimorfizm rs3204440

Polimorfizm rs2304205 (IRF3 - 5'UTR)

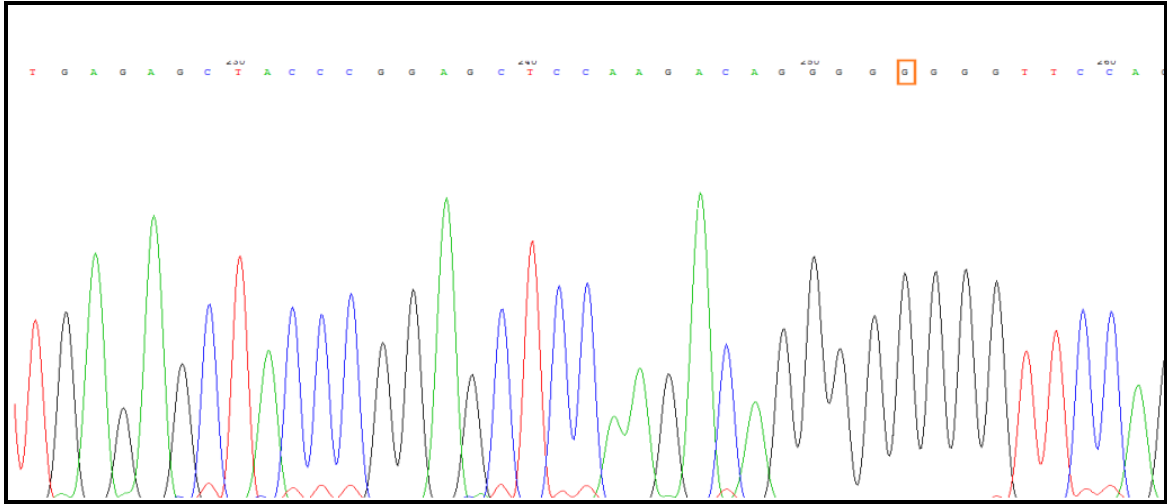
AAGACAGGGG[T/G]GGGTTCCAGC

T → G

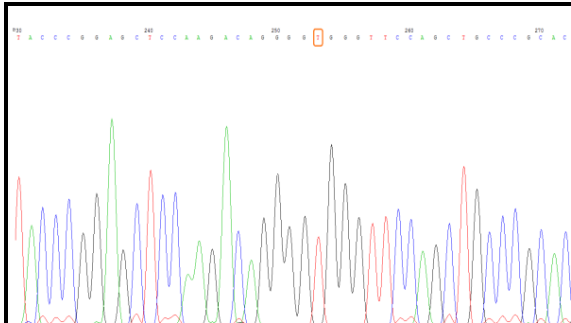
CCCCACCCCTCGTCAACACCCCGCTGACCTGGTCCGGGGCCCCACCGCCGCCTCCTCCAGTC
AACTTGCGGTCTCCTCCACTGAACTCGTACAACTTTATTAGTTCACTTTCCCGCGCCTGC
GCACTGGGCGGGTTCGATAACCGGCCAGCGTAGAAAGGGCGGAACGCTGGGTGCACCTCA
ATTTGCATGTGACGCTCCAGCATGCCTCTGGCCGGAAACCCAAAAAGGGCATAGGGCGG
GAACAGCCCAGCGGGCCGTCCCATCGGCTTTTGGGTCTGTTACCCAAAGAATGATTAAGTTG
GTTTTATTTCAAGAAAGTCGATCAAAAAGAAAGCCCCAGCGCTCTAGAGCTCAGCTGACGGGA
AAGGGGTGCGCAGCCTCGAGTTTGAGAGCTACCCGGAGCTCCAAGACAGGGGTGGGTTCCA
GCTGCCCCGACGCCCCGACCTTCCATCGTAGGTAACGCGGAAGAGCCCGGGAGAGCGTTGGT
GGCGTCCGAGAGCGAGGAGCGGGAAAGAGGATGGGTCTGCACGGAGAGTGGAAAGGCAGGCT
GTGTACTCTGGGGAAGTGGAGCAAGGAAGGAGCTACAGTGGCCGACGCTGGAGGTCGGCTG
CAGAAAACTAGAAAAAGTAGGGAGGAAAGAGGAAAGAGGAGGCGTCTACACTGAGGGGGT
TCTAGAGAGGGAGGGGTGGACTCCGTAGATGGGGGTAGTTTCACTCTCGAAACCTGGGGCGTG
CTCTGTCTTGAGAGAGGAGGCGGGCAGTCGGAGGGGAATTGAATG

Ekzon 1

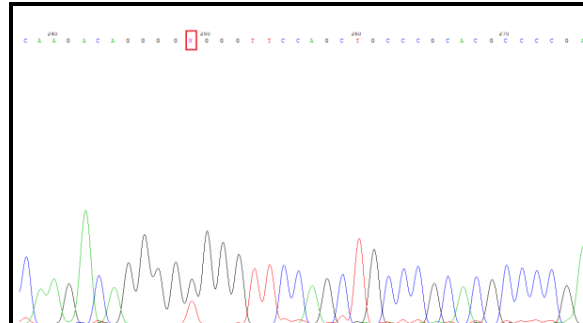
GG



TT

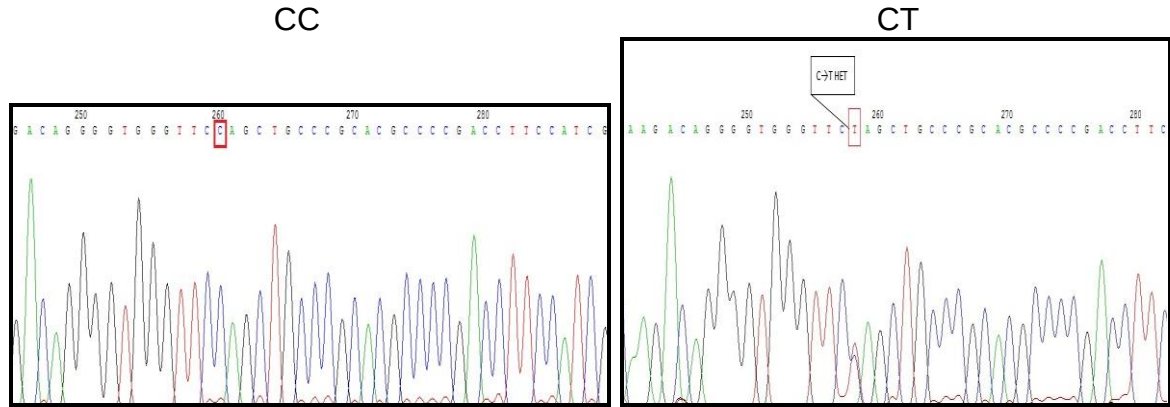


TG



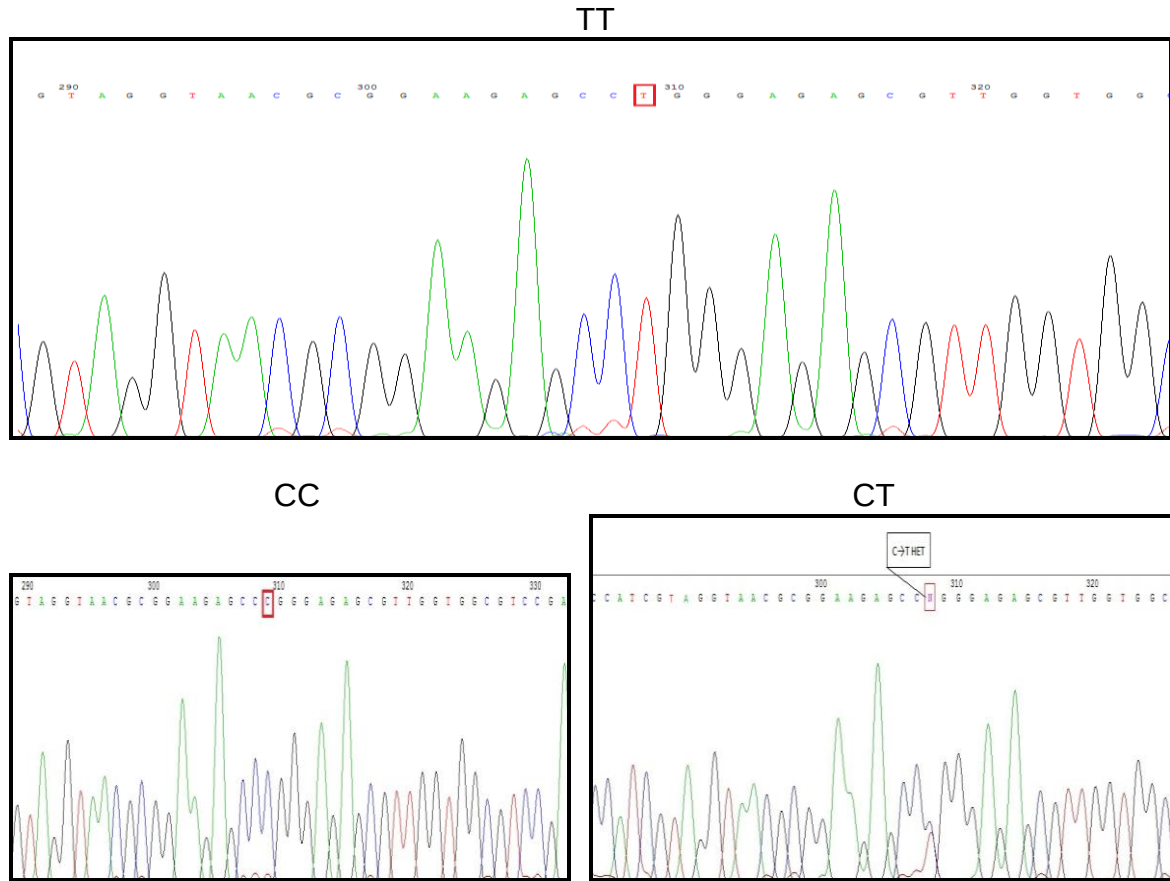
Şekil 4.4. IRF3 geni 5'UTR bölgesinde bulunan polimorfizm rs2304205

Polimorfizm rs139412285 (IRF3 - 5'UTR)



Şekil 4.5. IRF3 geni 5'UTR bölgesinde bulunan polimorfizm rs139412285

Polimorfizm rs2304206 (IRF3 - 1. intron)



Şekil 4.6. IRF3 geni 1. intron bölgesinde bulunan polimorfizm rs2304206

Polimorfizm rs34739574 (IRF3 - 1. intron)

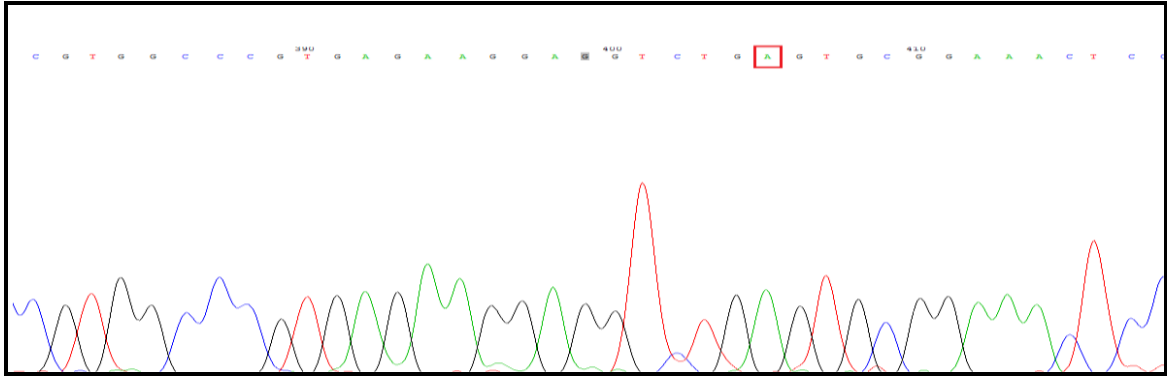
AGGGGTCTGG[G/A]GTGCGGAAACT

G → A

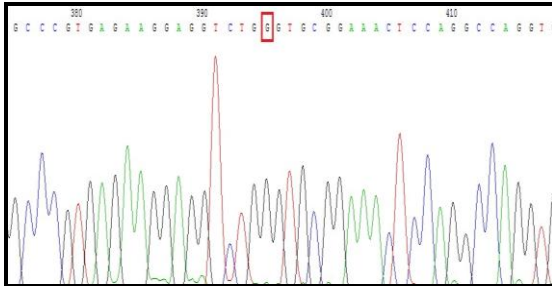
GAAGTTCTGTGTTGAAATGTTTTGGGAGATCTTCTGTAGGGGGACTCTGGAAGGGGGTCTA
CATTGGGGTAAGTGCAGGAGGTAGAGGCTTACACGTGAATCCATTCTGCACTGAAATAACTA
GGGAAAGAGGATGCTACCTGAAAGTGGGGATACTTCTTCGATGATGTGGGGGAGGGAGG
AGGTCTATACTGGCGGAATTGAGGGAGTGGAGGGTCTGCACCTGAAGACGCTGGGGGAAGGATG
TGCCATGGATATGGGAAGGAACCTAGCTGATTAGAGAGCCTCTCGGGAGGATGGGAGGATG
GGAAGAGGAGGTTTCTCTGTTGTACCCCCGAAAATATGGGTGAAGGACC'TGTGCCGTGGCCC
GTGAGAAGGAGGTCTGGGTGCGGAAACTCCAGGCCAGGTGGGTCCGGGGGAGGCCGGTTCGCG
CCCAGGAAATGCCCTATACGCGCAGGCCGACCATGGGAACCCCAAAGCCACGGATCCTGCC
CTGGCTGGTGTGCGCAGCTGGACCTGGGGCAACTGGAGGGCGTGGCTGGGTGAACAAGAGCC
GCACGCGCTTCCGCATCCCTTGAAGCACGGCCCTACGGCAGGATGCACAGCAGGAGGATTTTC
GGAATCTTCCAGGTGCGTGCACGACCTGGGACGCTGGAAACCCGAGCTGCGCGCTGGGCG
GAAAGGACTCCTAGTGGGCCCGGCTGAGAAGCGGAGGTGGCGCGCAGGGGCGGGCTCGTG
CCAACGCTGGTGGGTGGGGCTAGAACGGGAGGGGCGGGGCTAGCCG

Ekzon 2

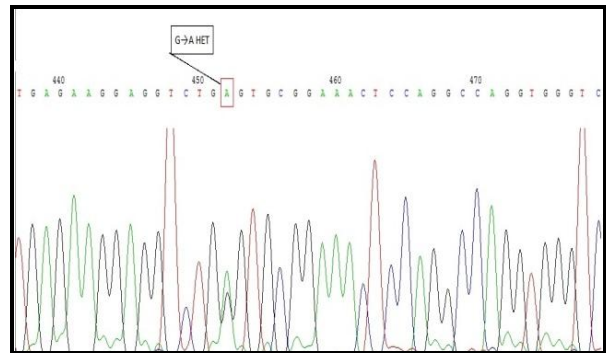
AA



GG



GA

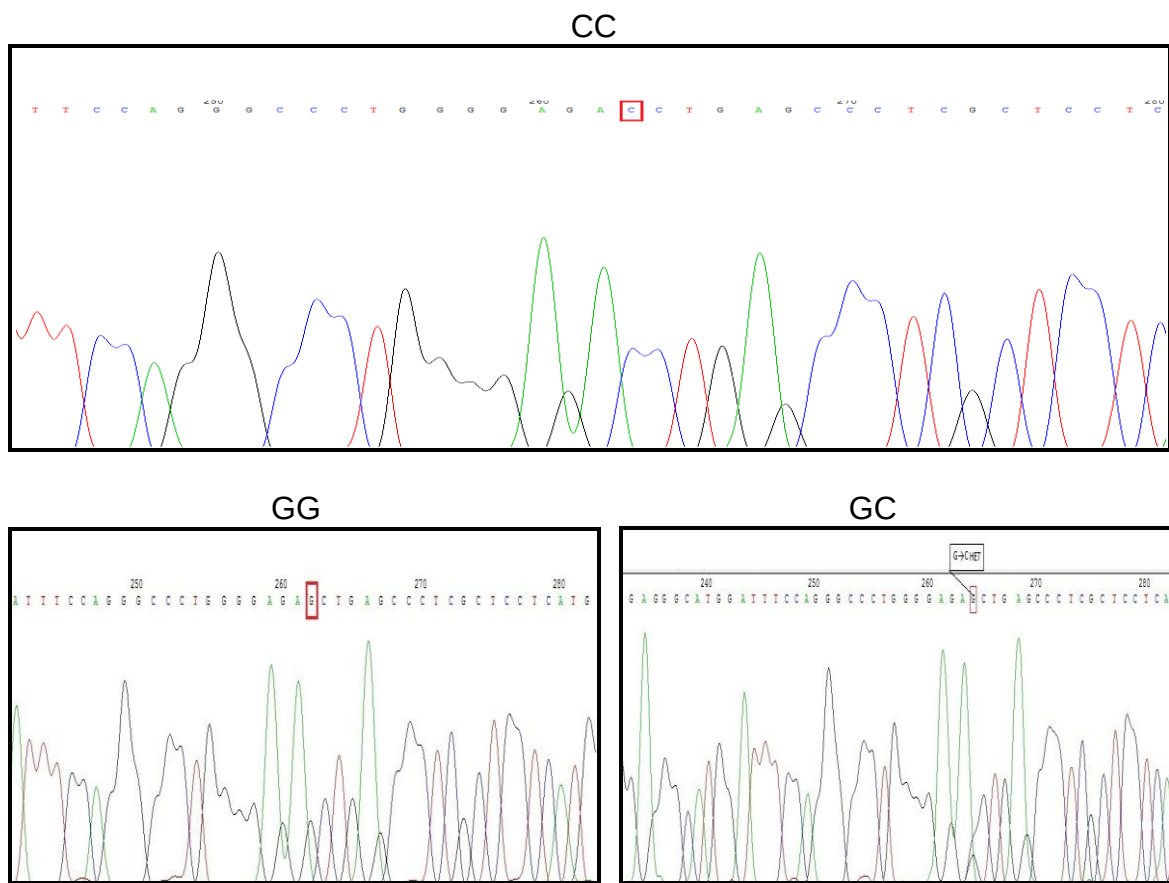


Şekil 4.7. IRF3 geni 1. intron bölgesinde bulunan polimorfizm rs34739574

CCTGGGGAGA[G/C]CTGAGCCCT

CAGGGGCTGCAGGGAGTTGTAGTCTCTCCAAGCCCTGACTCCTACCTTGGTGGACAGTGGCTG
GGTGTTTTCCCTGACTCCTGTCCCCACTTCCCCTGCAGGTTGTGCCACGTGCCTCAGGGCC
TTGGTAGAAATGGCCCGGTAGGGGGTGCTCTCTCCCTGGGAGAATACTGTGGACCTGCACAT
TTCCAACAGCCACCACTCTCCCTCACCTCCGACCACTACAAGGCCTACCTGCAGGACTTGG
TGGAGGGCATGGATTTCAGGGCCCTGGGGAGAAGCTGAGCCCTCGCTCCTCATGGTGTGCCT
CCAACCCCCCTGTTCCCCACCACCTCAACCAATAAACTGGTTCTTGCTATGATCACTTGTGC
GTGTCTGGTGTGGGTGCCCTCTGACCCAATATGGTTGTTATTCCCCTCAGGGTCTCAGTT
TACCCATCTGTGCAGCTATATACAACCTCAGGTGCTCAATG

Ekzon 8



41

IRF3 5'UTR bölgede yer alan rs2304204 polimorfizimine ait DNA dizi analizi sonuçları

IRF3 rs2304204 gen polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçlarına göre, 25 bireylik astım grubunda AA homozigot genotipi 7 (%28) bireyde, AG heterozigot genotipi 16 (%64) bireyde ve GG homozigot genotipi ise 2 (%8) ve kontrol grubunda AA homozigot genotipi 10 (%40) bireyde, AG heterozigot genotipi 15 (%60) bireyde ve GG homozigot genotipi ise 0 (%0) bireyde gözlenmiştir.

IRF3 5'UTR bölgede yer alan rs3204440 polimorfizimine DNA dizi analizi sonuçları

IRF3 rs3204440 gen polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçlarına göre, 25 bireylik astım grubunda TT homozigot genotipi 13 (%52) bireyde, TC heterozigot genotipi 12 (%48) bireyde ve CC homozigot genotipi ise 0 (%0) ve kontrol grubunda TT homozigot genotipi 22 (%88) bireyde, TC heterozigot genotipi 3 (%12) bireyde ve CC homozigot genotipi ise 0 (%0) bireyde gözlenmiştir.

IRF3 1. intron bölgede yer alan rs2304206 polimorfizimine ait DNA dizi analizi sonuçları

IRF3 rs2304206 gen polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçlarına göre, 25 bireylik astım grubunda CC homozigot genotipi 7 (%28) bireyde, CT heterozigot genotipi 16 (%64) bireyde ve TT homozigot genotipi ise 2 (%8) ve kontrol grubunda CC homozigot genotipi 9 (%36) bireyde, CT heterozigot genotipi 16 (%64) bireyde ve TT homozigot genotipi ise 0 (%0) bireyde gözlenmiştir.

IRF3 5'UTR bölgede yer alan rs2304205 polimorfizimine DNA dizi analizi sonuçları

IRF3 rs2304205 gen polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçlarına göre, 25 bireylik astım grubunda TT homozigot genotipi 7 (%28) bireyde, TG heterozigot genotipi 16 (%64) bireyde ve GG homozigot genotipi ise 2 (%8) ve kontrol grubunda TT homozigot genotipi 9 (%36) bireyde, TG heterozigot genotipi 16 (%64) bireyde ve GG homozigot genotipi ise 0 (%0) bireyde gözlenmiştir.

IRF3 1. intron bölgede yer alan rs34739574 polimorfizmine DNA dizi analizi sonuçları

IRF3gen rs34739574 polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçlarına göre, 25 bireylik astım grubunda GG homozigot genotipi 20 (%80) bireyde, GA heterozigot genotipi 4 (%16) bireyde ve AA homozigot genotipi ise 1 (%4) ve kontrol grubunda GG homozigot genotipi 20 (%80) bireyde, GA heterozigot genotipi 5 (%20) bireyde ve AA homozigot genotipi ise 0 (%0) bireyde gözlenmiştir.

IRF3 5'UTR bölgede yer alan rs139412285 polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçları

IRF3 gen rs139412285 polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçlarına göre, 25 bireylik astım grubunda CC homozigot genotipi 25 (%100) bireyde, CT heterozigot genotipi 0 (%0) bireyde ve TT homozigot genotipi ise 0 (0) ve kontrol grubunda CC homozigot genotipi 24 (%96) bireyde, CT heterozigot genotipi 1 (%4) bireyde ve TT homozigot genotipi ise 0 (%0) bireyde gözlenmiştir.

IRF3 Ekzon 8 bölgede yer alan rs7251 polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçları

IRF3rs7251 gen polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçlarına göre, 25 bireylik astım grubunda GG homozigot genotipi 10 (%40) bireyde, GC heterozigot genotipi 10 (%40) bireyde ve CC homozigot genotipi ise 5 (%20) ve kontrol grubunda GG homozigot genotipi 12 (%48) bireyde, GC heterozigot genotipi 10 (%40) bireyde ve CC homozigot genotipi ise 3 (%12) bireyde gözlenmiştir.

Kontrol ve hasta grupları için Türk popülasyonunda IRF3 geni 5'UTR bölgesinde rs2304204, rs2304205, rs3204440 ve rs139412285 polimorfizmleri, 1. intronunda rs2304206 ve rs34739574 polimorfizmleri ve 8. ekzonunda rs7251 polimorfizmine ilişkin genotipleme çalışmalarına ait genotip ve alel frekanslarının dağılımı Çizelge 4.2 'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. IRF3 geninde bulunan (rs2304204, rs2304206, rs2304205, rs320440, rs34739574, rs139412285, rs139412285 ve rs7251) polimorfizmlerin oluşturduğu genotip ve alel frekanslarının kontrol ve hasta grubunda dağılımı

	Astımlılar	Kontroller	P
IRF3 (rs2304204)	n=25 (%)	n=25 (%)	
Genotip			
AA	7 (28)	10 (40)	0.268
AG	16 (64)	15 (60)	
GG	2 (8)	0 (0)	
Alel	n=50 (%)	n=50 (%)	0.295
A	30 (60)	35 (70)	
G	20 (40)	15 (30)	
IRF3 (rs2304206)	n=25 (%)	n=25 (%)	
Genotip			
CC	7 (28)	9 (36)	0.325
CT	16 (64)	16 (64)	
TT	2 (8)	0 (0)	
Alel	n=50 (%)	n=50 (%)	0.405
C	30(60)	34(68)	
T	20(40)	16(32)	
IRF3 (rs2304205)	n=25 (%)	n=25 (%)	
Genotip			
TT	7 (28)	9 (36)	0.325
TG	16 (64)	16 (64)	
GG	2 (8)	0 (0)	
Alel	n=50 (%)	n=50 (%)	0.405
T	30(60)	34(68)	
G	20(40)	16(32)	
IRF3 (rs320440)	n=25 (%)	n=25 (%)	
Genotip			
TT	13 (52)	22 (88)	0.012
TC	12 (48)	3 (12)	
CC	0 (0)	0 (0)	
Alel	n=50 (%)	n=50 (%)	0.023
T	38(76)	47(94)	
C	12(24)	3(6)	
IRF3 (rs7251)	n=25 (%)	n=25 (%)	
Genotip			
GG	11 (40)	12(48)	0.5
GC	9 (40)	10 (40)	
CC	5 (20)	3 (12)	
Alel	n=50 (%)	n=50 (%)	0.5
G	31(62)	34(68)	
C	19(38)	16(32)	

p değeri ki-kare (χ^2 Fisher's Exact Test) testi sonucunda elde edilmiştir.

25 astımlı bireyde IRF3 geninin genotipleme sonucunda en çok rastlanan motifler 5 kişi, rs2304204 (AG), rs3204440 (TC), rs2304205 (TG), rs2304206 (CT), rs34739574 (GG), rs139412285 (CC) ve rs7251 (GC) ve 5 kişi rs2304204 (AG), rs3204440 (TC), rs2304205 (TG), rs2304206 (CT), rs34739574 (GG), rs139412285 (CC) ve rs7251 (GG)'dir. Ancak sağlıklı bireylerde en çok görülen motifler (5 kişi) rs2304204 (AG), rs3204440 (TT), rs2304205 (TG), rs2304206(CT), rs34739574 (GG), rs139412285 (CC) ve rs7251 (GC) oldu, Saptanan tüm polimorfizimlerin genotiplenme sonuçları Çizelge 4.3 ve 4.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. 25 astımlı bireyde IRF3 geninin genotipleme sonuçları

Astım	rs2304204	rs3204440	rs2304205	rs2304206	rs34739574	rs139412285	rs7251
1-bal50	AG	TC	TG	CT	GG	CC	GG
2-bal82	AG	TC	TG	CT	GG	CC	CC
3-bal100	AA	TT	TT	CC	GG	CC	CC
4-bal256	AG	TC	TG	CT	GG	CC	GC
5-bal287	AA	TT	TT	CC	GA	CC	GG
6-bal290	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GG
7-cs73	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GG
8-cs118	GG	TT	GG	TT	GG	CC	CC
9-cs206	GG	TT	GG	TT	GG	CC	CC
10-cs307	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GC
11-cs409	AA	TT	TT	CC	GA	CC	GG
12-cs466	AG	TT	TG	CT	GA	CC	GC
13-cs499	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GC
14-cs503	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GC
15-cs520	AG	TC	TG	CT	GG	CC	CC
16-cs551	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GC
17-cs588	AG	TC	TG	CT	GG	CC	GG
18-cs691	AG	TC	TG	CT	GA	CC	GG
19-cs731	AG	TC	TG	CT	AA	CC	GG
20-cs817	AG	TC	TG	CT	GG	CC	GC
21-cs857	AG	TC	TG	CT	GG	CC	GG
22-cs923	AG	TC	TG	CT	GG	CC	GG
23-cs1100	AG	TC	TG	CT	GG	CC	GC
24-cs1108	AG	TC	TG	CT	GG	CC	GC
25-cs1242	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GG

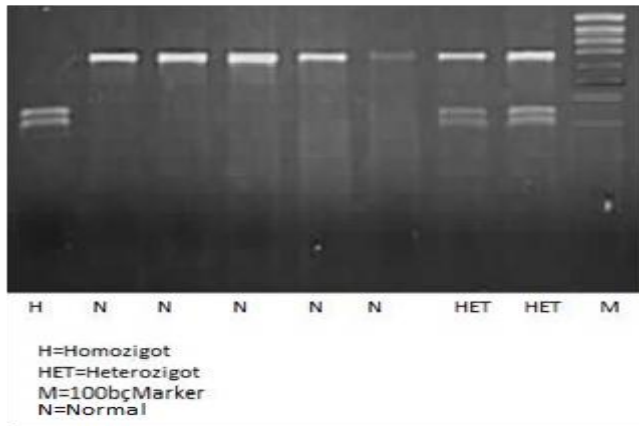
Çizelge 4.4. 25 kontrol bireyde IRF3 geninin genotipleme sonuçları

Kontrol	rs2304204	rs3204440	rs2304205	rs2304206	rs34739574	rs139412285	rs7251
1-sk5	AG	TC	TG	CT	GG	CC	CC
2-sk21	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GC
3-sk24	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GG
4-sk27	AA	TT	TG	CT	GG	CC	GC
5-sk29	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GC
6-sk31	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GG
7-sk33	AA	TT	TT	CC	GA	CC	GG
8-sk35	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GG
9-sk42	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GG
10-sk43	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GC
11-sk44	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GC
12-sk45	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GG
13-sk46	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GC
14-sk68	AG	TT	TG	CT	GG	CC	CC
15-sk69	AG	TC	TG	CT	GG	CC	CC
16-sk70	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GG
17-sk80	AG	TT	TG	CT	GA	CC	GC
18-sk81	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GG
19-sk87	AG	TC	TG	CT	GG	CC	GC
20-sk110	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GG
21-sk116	AG	TT	TG	CT	GA	CC	GC
22-sk122	AA	TT	TT	CC	GA	CT	GG
23-sk126	AA	TT	TT	CC	GG	CC	GG
24-sk130	AA	TT	TT	CC	GA	CC	GG
25-sk135	AG	TT	TG	CT	GG	CC	GC

4.3. IRF3 1. İntron ve 5'UTR Bölgelerinde Yer Alan rs34739574 ve rs139412285 Polimorfizimlerinin Genotiplleme Sonuçları

DNA dizi analiz sonuçları rs34739574 ve rs139412285 polimorfizimlerinin Türk popülasyonda taranmaya başlandı ve sıklıkları belirlendi. IRF 3 geni DNA dizisi üzerinde ileri ve ters amplikasyon primerleri yeşil, Dde I kesim noktası sarı ve rs34739574(G/A) plimorfizim kırmızı ile belirtilmiştir. PZR ürünün büyüklüğü 661bç'dir. Dde I enzimi A allelini keser ve 354 ve 307 bç'lik iki parçaya ayırır. IRF3 geni DNA dizisi üzerinde ileri ve ters amplikasyon primerleri yeşil, Bfa I kesim noktası sarı ve rs139412285 (C/T) nükleotit değişiklik noktası kırmızı ile belirtilmiştir. PZR ürünün büyüklüğü 661bç'dir. Bfa I enzimi T allelini keser ve 200 ve 48 bç'lik iki parçaya ayırır. Amplifikasyon primerleri, enzim kesim noktası, enzimin özelliği ve kesim sonrası agaroz jel görüntüsü Şekil 4.9 ve 4.10. üzerinde verilmiştir

```
GTTGGAAATGTTTTGGGAGATCTTCTGTAGGGGGCACTCTGCAACGGGGTCTACATTGGGGT
AAGTGCAGGAGGTAGAGGCTTACACGTGAATCGATTCTGCACTGAAATACTAGGGAAAGA
GGATGCTACCCGTGAAAGTGGGGATACTTACTTTTCGATGATGTGGGGAGGGAGGAGGTCTA
TACTGGCGGAATTGAGGGAGTGGAGGGTCTGCACTGAAGACGCTGGGGAAGGATGTGCCAT
GGATATGGGAAGGAACCCTAGCTGATTAGAGAGCCTCTCGGGAGGATGGGAGGATGGGAAG
AGGAGGTTTTCCTGTTTGTACCCCCGAAAATATGGGTGAAGGACCTGTGCCGTGGCCCGTGA
GAAGGAGGTCTGCGTGCAGGAACTCCAGGCCAGGTGGGTCCGGGGGAGGCCGGTCCGCGCCC
AGGAAATGCCCTATACGCGCAGGCCGACCATGGGAACCCCAAAGCCACGGATCCTGCCCT
GGCTGGTGTTCGAGCTGGACCTGGGGCAACTGGAGGGCGTGGCCTGGGTGAACAAGAGCCG
CACGCGCTTCCGCATCCCTTGGAAGCACGGCCTACGGCAGGATGCACAGCAGGAGGATTTC
GGAATCTTCCAGGTGCGTGCGACGACCTGGGACGCTGGAAACCCGGAGCTGCGCGCTGGGC
GGAAAGGACTCCTAGTGGGCCCCGGCTGAGAAGGCGGAGGTGGCGCGCGA
```



Şekil 4.9. IRF3 geni sekans dizi üzerinde amplikasyon primerleri ve Dde I kesim noktası ve rs34739574 nükleotit değişiklik noktası belirtilmiştir. Restriksiyon

endonükleaz ile kesim sonucunda oluşan görüntü agaroz jel elektroforezi resminde gösterilmektedir.

```
CTGCGCACTGGGCCGGGTCGATAACCGGCCAGCGTAGAAAGGGCGGAACGCTGGGTGCAC
GCTCAATTTGCATGTGACGCTCCAGCATGCCTCTGGCCGGAAACCCAAAAAGGGCATAG
GGGCGGGAACAGCCCAGCGGGCCGTCCTATCGGCTTTTGGGTCTGTTACCCAAAGAATGAT
AAAGTTGGTTTTATTTCAGAAAGTCGATCAAAAAGAAAGCCCCAGCGCTCTAGAGCTCAGC
TGACGGGAAAGGGGGTGCGCAGCCTCGAGTTTGAGAGCTACCCGGAGCTCCAAGACAGGGG
TGGGTTCCAGCTGCCCCGCACGCCCCGACCTTCCATCGTAGGTAACGCGGAAGAGCCCGGA
GAGCGTTGGTGGCGTCCGAGAGCGAGGAGCGGGAAGAGGATGGGTCTGCACGGAGAGTGG
AAAGGCAGGCTGTGTACTCTGGGGAAAGTGGAGCAAGGAAGGAGCTACAGTGGCCGACGCT
GGAGCTCGGCTGCAGAAAACTAGAAAAAGTAGGGAGGAAAGAGGAAAAGAGGAGGCGTCT
ACACTGAGGGG
```



N= Normal
HET= Heterozigot
M= 100bpMarker

Thermo
SCIENTIFIC

PRODUCT INFORMATION

FspBI
(BfaI)

#ER1762 2500 U

Lot: 00160161 Expiry Date: 06.2016

5'...C↓T A G...3'

3'...G A T↑C...5'

Concentration: 10 U/μL

Source: *Flavobacterium species* RFL1

Supplied with: 1 mL of 10X Buffer Tango

Store at -20°C



Şekil 4.10. IRF3 geni sekans dizi üzerinde amplikasyon primerleri yeşil, Bfa I kesim noktası ve rs139412285 nükleotit değişikliği belirtilmiştir. Restriksiyon endonükleaz ile kesim sonucunda oluşan görüntü agaroz jel elektroforezi resminde gösterilmektedir.

4.3.1. IRF3 rs34739574 Polimorfik Bölgesinin Dde I Enzimi Kesim Sonuçlar

Astımlı ve sağlıklı bireylerin IRF3 genotiplenmesi sonucunda saptanan rs34739574 polimorfizim iki grup arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. Sağlıklı ve astımlı bireylerde IRF3 rs34739574 polimorfizminde genotip dağılımı

IRF3 rs34739574 genotipi	Sağlıklı (n=195) (%)	Astımlı (n=530) (%)	P
GG	161 (82,6)	417 (78,6)	0.471
GA	31 (15,9)	100 (19)	
AA	3 (1,5)	13 (2,3)	

p değeri ki-kare (χ^2 Fisher's Exact Test) testi sonucunda elde edilmiştir.

Çizelge 4.6. Astımlı ve sağlıklılarda IRF3 rs34739574 polimorfizme ait alel dağılımı

IRF3 rs34739574 alel	Astımlı (n=1060) (%)	Sağlıklı (n=390) (%)	p
G	934(88,1)	353(90,5)	0,2
A	126(11,9)	37 (9,5)	

4.3.2. IRF3 rs139412285 Polimorfik Bölgesinin Bfa I Enzimi Kesim Sonuçları

Astımlı ve sağlıklı bireylerin IRF3 genotiplenmesi sonucunda saptanan rs139412285 polimorfizim iki grup arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. Sağlıklı ve astımlı bireylerde IRF3 rs139412285 polimorfizminde genotip dağılımı

IRF3 rs139412285 genotipi	Sağlıklı (n=204) (%)	Astımlı (n=170) (%)	P
CC	203 (99,5)	169 (99,4)	1
CT	1 (0,5)	1 (0,6)	
TT	0 (0)	0 (0)	

p değeri ki-kare (χ^2 Fisher's Exact Test) testi sonucunda elde edilmiştir.

Çizelge 4.8. Sağlıklı ve astımlılarda IRF3 rs139412285 polimorfizme ait alel dağılımı

IRF3 rs139412285 alel	Astımlı (n=408) (%)	Sağlıklı (n=340) (%)	p
C	407(99,8)	339(99,7)	1
T	1(0,2)	1 (0,3)	

Çalışmamızda dahil edilen Sağlıklı ve astımlı bireylerin bazı özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Sağlıklı bireylerle hasta bireylerin karşılaştırılması yapıldığında, yaş ve hayvan teması bakımından hastaların astım yatkınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ama cinsiyet, FEV1 değeri, IgE düzeyi, Deri testlerinde duyarlılıkları, Eozinofil sayısı, Ailede allerjik hastalık öyküsü ve Sigara ile karşılaşmalarında hastaların astım yatkınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Sağlıklı ve astımlı çocukların özellikleri

	Sağlıklı n=191	Astımlı n=613	p
Yaş (yıl)*	10,7 (8,1-13,1)	10,6 (8,1-13,5)	>0,05
Cinsiyet, n (%)			
Erkek	92 (%48,2)	394 (%64,3)	<0,001
Kadın	99 (%51,8)	219 (%35,7)	
FEV1 (%)*	101 (91-108)	94 (85-104)	<0,001
IgE (kU/L)*	35 (17-73)	184 (70-485)	<0,001
Deri testlerinde duyarlılık, n (%)	31 (%16,2)	391 (%63,8)	<0,001
Eozinofil sayısı (mm ³)*	141 (99-273)	290 (170-480)	<0,001
Ailede allerjik hastalık öyküsü, n (%)	21 (%11)	224 (%36,5)	<0,001
Sigara ile karşılaşma, n (%)	110 (%57,6)	252 (%41,1)	<0,001
Hayvan teması, n (%)	24 (%12,6)	36 (%5,9)	>0,002

*Ortanca (çeyrekler arası)

p değeri ki-kare (χ^2) testi sonucunda elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

İnterferon genlerinin ifadesi IRFs proteinleri tarafından kontrol edilir. İnterferon regülatör faktörler, transkripsiyon faktörlerin ailesindendir ve IFN ile uyarılan genlerin ve tip I IFN'lerin genlerin, IFN- α ve IFN- β dahil olmak üzere düzenlenmesinde önemli bir rolleri vardır. Tip I interferonlar (IFN), 13 adet yakından ilişkili IFN-A geni ile tek bir IFN-B geninden oluşan çok-genli aile tarafından kodlanan sitokinlerdir.

IRF ailesinin dokuz üyesi IRF-1 ile IRF-9 tespit edilmiştir. IRF-3 viral bir çift zincirli RNA veya bakteriyel lipopolisakkarit aracılı sinyal ile dolaysız aktive olması açısından, IRF aile üyeleri arasında benzersizdir. IRF-3 ile transaktive edilen hızlı erken cevap veren genler, hem viral enfeksiyona karşı doğuştan bağışıklık tepkisinde hem de ardından gelen adaptif bağışıklıkta kritik roller oynamaktadır.

Yapılan çalışmalar, IRF3 genindeki nükleotit değişikliklerinin önemini göstermektedir. 2007 yılında Garifulin ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen deneyler sonucunda IRF3 geninin intron 5 bölgesinde bulunan A /T polimorfizminin IFN- β 1 ifadesinin başlatılmasında etkili olduğunu göstermiştir [60].

Zhang ve arkadaşları çalışmalarında insan IRF3 geninin 8. ekzonunda yer alan ve kodon 427 pozisyonundaki treonin aminoasidini serin aminoasidine dönüştüren nükleotit değişikliğinin özofageal kansere duyarlılıkla ilişkisi olabileceğini göstermiştir. ($P<0,05$). Çin popülasyonunda CC genotip indeks katılımcılarda özofageal kanser riski, GG genotip sahip olanlardan 2,38 kat daha fazla olduğu saptanmıştır [61].

IRF3 geninin polimorfizmlerinin sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalığı ile ilişkisi de araştırılmıştır. Sánchez ve arkadaşlarının çalışmalarında, IRF3 polimorfizmlerinin (rs2304204, rs7251 ve rs2304207) İspanyol popülasyonda SLE duyarlılığı ya da şiddetinde önemli bir rol oynamadığını ileri sürmektedir [31]. Ama Akahoshi ve arkadaşların çalışmasında, Japon popülasyonunda, IRF3 geninin 5 adet SNP çalışmış ve bu 5 SNP'den 2 polimorfizim (rs2304204 ve rs2304206) SLE ile en belirgin ilişkiyi göstermiştir. GG genotip frekansı SLE hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştır [62].

Fang ve arkadaşların çalışmalarında Çin popülasyonun da IRF3 geninin polimorfizmleri ve hepatitis B virus (HBV) enfeksiyonuna duyarlılıkla ilişkisini

araştırılmıştır. Bu çalışmada, 985 Kronik HBV enfeksiyonu olan hasta ve 294 kendi kendini sınırlayan HBV ile enfekte olmuş birey kontrol olarak çalışıldı. IRF3 genindeki 3 polimorfizm rs10415576, rs2304204 ve rs2304206 seçildi. Bu 3 SNP'nin genotip (rs10415576, P = 0,2106; rs2304204, P = 0,8458; rs2304206, P = 0,8315) ve haplotip frekansları kontroller ve kronik HBV enfeksiyonu olan hastalar arasında herhangi bir anlamlı fark bulunmamıştır [5].

Astım patogeneğinde birçok gen rol oynamaktadır. Popülasyon ve linkaj çalışmalarının birlikte analiz edildiği çalışmalarda birçok genin astımla ilişkisi olabileceği gözlemlenmiştir.

Tip I interferonlar, (IFN α/β) interferon ile uyarılmış genler, Rantes ve IP-10 gibi bazı kemokin genler için gerekli bir transkripsiyonel aktivatörlerdir. Bunun yanı sıra Rantes, IP-10 ve IFN β genlerinin promotor bölgelerinde NF κ B ve IRF3 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma elementleri bulunmaktadır [63].

Yong-Gang Zhang ve arkadaşların yapmış oldukları deneylerde, meta-analiz çalışmaları için 10 vaka / kontrol grubu (toplam 1706 vaka ve 1685 kontrol) belirlenmiştir. Bu çalışmada Rantes genindeki 2 polimorfizm (-403G/A ve -28C/G) ile astım riski arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmış ve bu iki SNP ve astım hastalığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. 3 alt grup analizleri incelendiğinde 2 alt grupta yani köken (Asyalı, Avrupalılar ve Afrikalı-Amerikalılar kökenli bireylerde) ve bireylerin yaşına göre -403G/A pozisyonundaki SNP, astım ve Rantes geninin polimorfizimleri ile ilgili ilişkisi anlamlı bulunmadı ama grup atopik durum analizinde, bu SNP ile anlamlı olan bir ilişki bulunmuştur[64].

Genetik materyali çift zincirli RNA olan virüsler TLR3'e, bakteriyel endotoksin lipopolisakkarit ise TLR4'e bağlanır ve IRF3 sinyal yolunu aktive ederek tip I IFN'ların salgılanmasına sebep olmaktadır. Bu aktivasyonun hücresel yollardan biri endotoksin sinyal yoludur. endotoksin sinyal yolu, astımda da etkili hücresel yollardan biridir. Endotoksin, gram-negatif bakterilerin hücre zarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır ve doğada hazır olarak bulunmaktadır. Astım yaygınlığı son yıllarda yükselmiştir ve özellikle hastanelerde daha uzun kalmak ve mortalite ile ilişkilendirilmiştir. Astım hava yollarının aşırı hassasiyeti ve daralması ile karakterize edilen kronik bir solunum sistemi hastalığıdır. İnflamatuvar hücrelerin

görev aldığı inflamasyon, epitel hücre hasarı ve hava yolu daralmasına yol açan aşırı mukus üretimi astım hastalarında görünen genel patolojik bulgulardır. Astım hastalığının meydana geldiğinde hem genetik hem de çevresel faktörler etkilidir [64].

Endotoksin sinyal yolundaki görev alan bazı proteinlerin genlerindeki (TLR2, TLR4 ve CD14) genetik değişikliklerin astım ve atopi ile ilişkisi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.

Lachheb ve arkadaşların çalışmalarında 210 çocuk astımlı hasta, 224 kontrol ve 80 aile ile TLR2 (12408 G/A), TLR4 (11196 C/T), TLR4 (1896A/G), TLR9 (21237 T/C), TLR9 (21486 T/C) ve CD14 (2159 C/T) genlerindeki polimorfizmlerin astım hastalığı ile ilişkisi araştırılmıştır. CD14, C alleli astımlı grupta kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur [55].

Saçkesen ve arkadaşların çalışmalarında CD14 geni promotor bölgede yer alan C159T değişikliğinin, kodominant modelde üç genotip (CC, CT, TT) arasında, atopik astımlı çocuklarda total IgE düzeylerinin farklı olduğunu ve TT genotipinin düşük IgE düzeyi ile anlamlı olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte atopiye sahip hafif astımlı grupta, TLR4 (A896G ve C1196T) polimorfizmlerinin daha yüksek sıklıkta olduğu da bulunmuştur [56].

Sahiner ve arkadaşların çalışmalarında, MAPK8 ve CD14 genlerinde değişimlerin astım fenotipi ile ilişkili bulunmuştur. Yine bu çalışmanın sonucuna göre ilk defa IRF3 genindeki tek nükleotid değişikliğinin (rs7251) astım ve astım fenotipi ile ilişkili olabileceği de gösterilmiştir [59].

Literatür bilgileri tarandığında, IRF3 genindeki genetik değişikliklerin astım ile ilişkisini gösteren başka bir veriye rastlanmamıştır. IRF3 molekülü ileriki çalışmalar ile astım tanı ve tedavisinde hedef molekül olmaya iyi bir aday gen potansiyeline sahip olabileceği söylenebilir.

Bu çalışmada yapılan DNA dizi analiz sonucunda IRF3 geninin 5'UTR, 1. intronunda ve ekzon 8 bölgelerinde toplam yedi adet tek nükleotit değişikliği bulunmuştur. Bu yedi polimorfizimin 3 ünün (rs2304204, rs2304205, rs2304206) birlikte kalıtıldığı belirlenmiştir. Bulunan polimorfizimler genin 5'UTR (rs2304204, rs3204440, rs2304205, rs139412285, 1. intron (rs2304206, rs34739574) ve ekzon 8 (rs7251) bölgelerinde yer almaktadırlar ve bu polimorfizimlerin motif yapıları rs2304204 ATC[A/G]AAA, rs3204440 AGC[T/C]CCA, rs2304205 GGG[T/G]GGG,

rs139412285 TTC[C/T]AGC, rs2304206 GCC[C/T]GGG, rs34739574 TGG[G/A]GTG, rs7251 AGA[G/C]CTG şeklindedir.

IRF3 genin özelliğinden ötürü, 1. intron 5' UTR bölgesinin içinde yer almaktadır. Bu nedenle 5'UTR da bulduğumuz SNPlar de önem kazanmaktadır. Çalışmamızda, IRF3 rs2304204 gen polimorfizmine ait DNA dizi analizi sonuçlarına göre, genotip frekanslarına bakıldığında homozigot AA genotipi oranları 2 grup (25 astımlı, 25 kontrol) arasında farklılıklar göstermektedir. AA genotipi hasta grubunda %28 oranında gözlenirken, kontrol grubunda %40 olarak gözlenmiştir ve GG genotipi hasta grubunda %8 oranında gözlenirken, kontrol grubunda GG genotipine rastlanmamıştır (Çizelge 4.2).

IRF3 rs3204440 gen polimorfizm için DNA dizi analizi sonuçlarına göre, genotip frekanslarına bakıldığında homozigot TT genotipi ve heterozigot TC genotipi oranları 2 grup arasında farklılıklar göstermektedir. TT genotipi hasta grubunda %52 oranında gözlenirken, kontrol grubunda %88 olarak ve TC genotipi hasta grubunda %48 oranında gözlenirken, kontrol grubunda %12 olarak gözlenmiştir ve CC genotipi 2 hasta ve kontrol gruplarında rastlanmamıştır. rs3204440 gen polimorfizmine ait Türk popülasyonunu yaptığımız çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularla yapılan istatistiksel analizler sonucunda, astım ile bu gen polimorfizmi arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

IRF3 rs2304206 gen polimorfizm için DNA dizi analizi sonuçlarına göre, genotip frekanslarına bakıldığında homozigot CC genotipi ve heterozigot CT genotipi oranları 2 grup arasında bariz farklılıklar göstermemektedir ama TT genotipi hasta grubunda %8 oranında gözlenirken, kontrol grubunda TT genotipine rastlanmamıştır. IRF3 rs2304205 gen polimorfizm için de DNA dizi analizi sonuçlarına göre, genotip frekanslarına bakıldığında homozigot TT genotipi ve heterozigot TG genotipi oranları 2 grup arasında bariz farklılıklar göstermemektedir ama GG genotipi hasta grubunda %8 oranında gözlenirken, kontrol grubunda GG genotipine rastlanmamıştır (Çizelge 4.2).

IRF3 rs34739574 gen polimorfizm için de DNA dizi analizi sonuçlarına göre, genotip frekanslarına bakıldığında homozigot GG genotipi ve heterozigot GA genotipi oranları 2 grup arasında bariz farklılıklar göstermemektedir ama AA genotipi hasta grubunda %4 oranında gözlenirken, kontrol grubunda AA

genotipine rastlanmamıştır. Çalışmamızda bu polimorfizm için rs34739574 hasta ve kontrol birey sayımızı çoğaltarak (530 hasta ve 195 kontrol) araştırmamızı genişlettik. rs34739574 gen polimorfizmine ait Türk popülasyonunu tanımlayan bir örnekleme yaptığımız çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularla yapılan istatistiksel analizler sonucunda, astım ile bu gen polimorfizmi arasında anlamlı fark olduğu belirlenmemiştir. RFLP sonuçlarına göre homozigot GG genotipi hasta grubunda %78,7 oranında gözlenirken, kontrol grubunda %82,6 olarak gözlenmiştir ve heterozigot GA genotipi %18,9 oranında gözlenirken, kontrol grubunda %15,9 olarak gözlenmiştir. Homozigot AA genotipi hasta grubunda %2,5 oranında gözlenirken, kontrol grubunda %1,5 olduğu belirlenmemiştir (Çizelge 4.5).

IRF3 rs139412285 gen polimorfizm için de DNA dizi analizi sonuçlarına göre, genotip frekanslarına bakıldığında homozigot CC genotipi ve heterozigot CT genotipi oranları 2 grup arasında bariz farklılıklar göstermemektedir ve TT genotipine 2 grupta rastlanmadık. Bu tez çalışmamızda DNA dizi analizi sonuçlarını dikkate alarak bu polimorfizm için rs139412285 204 hasta ve 170 kontrole kadar sayımızı çoğaltarak araştırmamızı genişlettik. rs139412285 gen polimorfizmine ait Türk popülasyonunda yaptığımız çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularla, astım ile bu gen polimorfizmi arasında anlamlı fark olduğu belirlenmemiştir. RFLP sonuçlarına göre homozigot CC genotipi hasta grubunda %99,5 oranında gözlenirken, kontrol grubunda %99,4 olarak gözlenmiştir ve heterozigot CT genotipi %0,5 oranında gözlenirken, kontrol grubunda %0,6 olarak gözlenmiştir. Homozigot TT genotipi hasta ve kontrol grubunda gözlenmemiştir (Çizelge 4.7).

Çalışmamızda IRF3 geninde DNA dizi analizi sonuçlarına göre bulduğumuz son rs7251 polimorfizmine ait, genotip frekanslarına bakıldığında homozigot GG genotipi, heterozigot genotipi GC ve CC homozigot genotipi hasta ve kontrol grubunda benzer oranlarda gözlenirken, hasta ve kontrol arasında bir bariz fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.2).

Astımda da önemli olduğu bilinen endotoksin sinyal yolağında yer alan pek çok molekülün IRF3 proteini ile etkileşimini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ancak IRF3 ile genetik ve çevresel pek çok faktörün rol aldığı astımla ilgili çalışmalar oldukça azdır. Bu nedenle bu çalışma IRF3 genindeki nükleotit değişikliklerin

astımla ne kadar ilişkili olabileceğine ait bilgilere katkıda bulunması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- [1] Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., Tanaka, N., IRF family of transcription factors as regulators of host defense, *Annual Review of Immunology*, 19, 623-655, **2001**.
- [2] Microbiology and Immunology University of South Carolina, <http://pathmicro.med.sc.edu>.
- [3] Ryff, J.C., Bordens, R.W., Pestka, S., *Interferons and Interleukins Book*, Third Edition, Chapter 11, Pharmaceutical Biotechnology, **2007**.
- [4] Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., Fujita, T., Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300, *European Molecular Biology Organization Journal*, 17, 1087-1095, **1998**.
- [5] Yan, F., Gao, Y.-F., Lv, F., Zhang, T.-C., Li, X., Yin, H.F., No association between IRF3 polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus infection in Chinese patients, *World Journal of Gastroenterology*, 18, 388-392, **2012**.
- [6] Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P.M., Hiscott, J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation, *Molecular and Cellular Biology*, 18, 2986-2996, **1998**.
- [7] Dragan, A.I., Hargreaves, V.V., Makeyeva, E.N., Privalov, P.L., Mechanisms of activation of interferon regulator factor 3: The role of C-terminal domain phosphorylation in IRF-3 dimerization and DNA binding, *Journal of Nucleic Acids Research*, 35, 3525-3534, **2007**.
- [8] Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M.J., Ipage, C., Deluca, C., Interferon regulatory factors: the next generation, *The Journal of Gene Medicine*, 237, 1-14, **1999**.
- [9] GINA, Global Initiative for Asthma, **2012**.
- [10] de Freitas Almeida, G.M., de Oliveira, D.B., de Brito Magalhães, C.L., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G., Antiviral activity of type I interferons and interleukins 29 and 28a (type III interferons) against Apeu virus, *Antiviral Research*, 80, 302-308, **2008**.
- [11] Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Lambda Interferon (IFN-λ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo, *Journal of Virology*, 80, 4501-4509, **2006**.
- [12] Higgs, R., Jefferies, C.A., Targeting IRFs by ubiquitination: regulating antiviral responses, *Molecular and Cellular Therapeutics and RSC/ Research Institute, Royal College of Surgeons in Ireland*, **2008**.
- [13] Pichlmair, A., Reis e Sousa, C., Innate recognition of viruses, *Immunity*, 27, 370-383, **2007**.
- [14] Uematsu, S., Akira, S., Toll-like receptors and type I interferons, *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 15319-15323, **2007**.

- [15] Takaoka, A., Tamura, T., Taniguchi, T., Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis, *Cancer Science*, 99, 467-478, **2008**.
- [16] Lowther, W.J., Moore, P.A., Carter, K.C., Pitha, P.M., Cloning and functional analysis of the human IRF-3 promoter, *Journal of DNA and Cell Biology*, 18, 685-692, **1999**.
- [17] Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., Fujita, T., Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300, *European Molecular Biology Organization Journal*, 17, 1087-1095, **1998**.
- [18] Lin, R., Mamane, Y., Hiscott J., Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains, *Molecular and Cellular Biology*, 19, 2465-2474, **1999**.
- [19] Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., et al., IKK epsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway, *Natural Immunology*, 4, 491-496, **2003**.
- [20] Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P.M. and Hiscott, J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation, *Molecular and Cellular Biology*, 18, 2986-2996, **1998**.
- [21] Darnell, J.E. Jr., Kerr, I.M., Stark, G.R., Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins, *Science*, 264, 1415-1421, **1994**.
- [22] Dragan, A.I., Hargreaves, V.V., Makeyeva, E.N., Privalov, P.L., Mechanisms of activation of interferon regulator factor 3: The role of C-terminal domain phosphorylation in IRF-3 dimerization and DNA binding, *Journal of Nucleic Acids Research*, 35, 3525-3534, **2007**.
- [23] Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M.J., Ipage, C., Deluca, C., Interferon regulatory factors: the next generation, *The Journal of Gene Medicine*, 237, 1-14, **1999**.
- [24] Hiscott, J., Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation, *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 15325-15329, **2007**.
- [25] Kim, T., Kim, T.Y., Song, Y.H., Min, I.M., Yim, J., Kim, T.K., Activation of interferon regulatory factor 3 in response to DNA-damaging agents, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 30686-30689, **1999**.
- [26] Kim, T.K., Lee, J.S., Oh, S.Y., et al., Direct transcriptional activation of promyelocytic leukemia protein by IFN regulatory factor 3 induces the p53 dependent growth inhibition of cancer cells, *Cancer Research*, 67, 11133-11140, **2007**.
- [27] Duguay, D., Mercier, F., Stagg, J., et al., In vivo interferon regulatory factor 3 tumor suppressor activity in B16 melanoma tumors, *Cancer Research*, 62, 5148-5152, **2002**.

- [28] Kim, T.Y., Lee, K.H., Chang, S., et al., Oncogenic potential of a dominant negative mutant of interferon regulatory factor 3, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 15272-15278, **2003**.
- [29] Willman, C.L., Sever, C.E., Pallavicini, M.G., et al., Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia, *Science*, 259, 968-971, **1993**.
- [30] Fou, E., Li, K., Wong, C., Sumpterjr, R., Regulation of Interferon Regulatory Factor-3 by the Hepatitis C Virus Serine protease, *Journal of Science*, 300, 1145-1148, **2003**.
- [31] Talon, J., Horvat, C.M., Polley, R., Basler, C.F., Muster, T., Pales, P., Garcia-Saste, A., Activation of Interferon regulatory factor-3 is inhibited by the influenza A virus NSI protein, *Journal of Virology*, 74, 7989-7996, **2000**.
- [32] Sánchez, E., González-Gay, M.A., Callejas-Rubio, J.L., Ortego-Centeno, N., Sabio, J.M., Jiménez-Alonso, J., Micó, L., No evidence for genetic association of interferon regulatory factor 3 in systemic lupus erythematosus, *Lupus*, 18, 230-234, **2009**.
- [33] Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2007 (update), www.ginasthma.org
- [34] Wahn, U., Lau, S., Bergmann, R., et al. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99, 763-769, **1997**.
- [35] Türk Toraks Derneği Astım Tanı ve Tedavi Rehberi, **2010**.
- [36] Demir, A.U., Karakaya, G., Bozkurt, B., Sekerel, B.E., Kalyoncu, A.F., Asthma and allergic diseases in school children: third cross-sectional survey in the same primary school in Ankara, Turkey, *Pediatric Allergy and Immunology*, 15, 531-538, **2004**.
- [37] Saraclar, Y., Kuyucu, S., Tuncer, A., et al., Prevalence of asthmatic phenotypes and bronchial hyperresponsiveness in Turkish schoolchildren: an International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase 2 study, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 91, 477-484, **2003**. Erratum in: *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 92, 87, **2004**.
- [38] Ones, U., Akcay, A., Tamay, Z., Guler, N., Zencir, M., Rising trend of asthma prevalence among Turkish school children (ISAAC phases I and III), *Allergy*, 61, 1448-1453, **2006**.
- [39] Sekerel, B.E., Civelek, E., Karabulut, E., et al., Are risk factors of childhood asthma predicting disease persistence in early adulthood different in the developing world?, *Allergy*, 61, 869-877, **2006**.
- [40] Guler, N., Kiserleri, E., Ones, U., et al., Leptin: does it have any role in childhood asthma?, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114, 254-259, **2004**.
- [41] Sahin, B., Tatar, M., Factors affecting use of resources for asthma patients, *Journal of Medical Systems*, 30, 395-403, **2006**.
- [42] Holgate, S.T., Genetic and environmental interaction in allergy and asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104, 1139-1146, **1999**.

- [43] Ober, C., Perspectives on the past decade of asthma genetics, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116, 274-278, **2005**.
- [44] Weiss, S.T., Raby, B.A., Rogers, A., Asthma genetics and genomics, *Current Opinion in Genetics & Development*, 19, 279-282, **2009**.
- [45] Rogers, A.J., Raby, B.A., Lasky-Su, J., Murphy, A., Lazarus, R., Klanderman, B.J., Sylvia, J.S., Ziniti, J.P., Lange, C., Celedon, J.C., et al., Assessing the reproducibility of asthma candidate gene associations using genome-wide data, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2009**. [epub ahead of print].
- [46] Sleiman, P.M.A., Flory, J., Imielinski, M., et al, Variants of DENND1B Associated with Asthma in Children, *The New England Journal of Medicine*, **2011**.
- [47] Meyers, D.A., Winston-Salem, N.C., Genetics of asthma and allergy: What have we learned?, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126, 439-446, **2010**.
- [48] Buijs, J., Borsboom, G., van Gemund, J.J., et al., Toxocara seroprevalence in 5-year-old elementary schoolchildren: Relation with allergic asthma, *American Journal of Epidemiology*, 140, 839-847, **1994**.
- [49] Doyle, S.E., Vaidya, S.A., O'Connell, R., et al., IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program, *Immunity*, 17, 251-263, **2002**.
- [50] Molet, S., Qutaybo, H., Effects of corticosteroids on asthma pathology, *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 19, 638-708, **1999**.
- [51] Menzies-Gow, A., Robinson, D.S., Eosinophils, eosinophilic cytokines (interleukin-5), and antieosinophilic therapy in asthma, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 8, 33-38, **2002**.
- [52] Baldini, M., Lohman, I.C., Halonen, M., Erickson, R.P., Holt, P., Martinez, F.D., A polymorphism in the 5'-flanking region of the CD 14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum IgE, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20, 976-983, **1999**.
- [53] Smit, L.A., Heederik, D., Doekes, G., Koppelman, G.H., Bottema, R.W., Postma, D.S., Wouters, M., Endotoxin exposure, CD14 and wheeze among farmers a gene-environment interaction, *Occupational and Environmental Medicine*, 68, 826-831, **2011**.
- [54] Woo, J.G., Assa'ad, A., Heizer, A.B., Bernstein, J.A., Hershey, G.K., The -159 C-->T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 438-444, **2003**.
- [55] Lachheb, J., Dhifallah, I.B., Chelbi, H., Hamzaoui, K., Hamzaoui, A., Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children, *Tissue Antigens*, 71, 417-425, **2008**.
- [56] Saçkesen, C., Karaaslan, C., Keskin, O., Tokol, N., Tahan, F., Civelek, E., Soyer, O.U., Adalioglu, G., Tuncer, A., Birben, E., Oner, C., Kalayci, O., The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on

asthma phenotypes in Turkish children with asthma, *Allergy*, 60, 1485-1492, **2005**.

- [57] Keskin, O., Birben, E., Saçkesen, C., Soyer, O.U., Alyamaç, E., Karaaslan, C., Tokol, N., Ercan, H., Kalayci, O., The effect of CD14-c159T genotypes on the cytokine response to endotoxin by peripheral blood mononuclear cells from asthmatic children, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 97, 321-328, **2006**.
- [58] Sackesen, C., Birben, E., Soyer, O.U., Sahiner, U.M., Yavuz, T.S., Civelek, E., Karabulut, E., Akdis, M., Akdis, C.A., Kalayci, O., The effect of CD14 C159T polymorphism on in vitro IgE synthesis and cytokine production by PBMC from children with asthma, *Allergy*, 66, 48-57, **2011**.
- [59] Sahiner, U.M., Yavuz, T.S., Büyüktiryaki, B., Birben, E., Topaloğlu, E., Yaman, A., Tuncer, A., Atalay, R., Atalay, V., Sackesen, C., Akdiş, M., Akdiş, C., Kalayci, Ö., Endotoksin sinyal yolağında yer alan moleküllere ait genotiplerin IgE sentezi üzerine etkisi, *XVIII. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi*, Program ve Kongre Özet Kitabı, (P-180) sf: 89.
- [60] Garifulin, O., Qi, Z., Shen, H., Patnala, S., Green, M.R., Boyartchuk, V., Irf3 polymorphism alters induction of interferon beta in response to *Listeria monocytogenes* infection, *PLoS Genetics*, 3, 1587-1597, **2007**.
- [61] Zhang, C.F., Cao, B.W., Lu, Z.M., Xing, H.P., Cui, J.G., Ning, T., Ke, Y., Relationship between polymorphism of IRF-3 gene codon 427 and esophageal cancer in Anyang population of China, *Beijing Da Xue Xue Bao*, 36, 345-347, **2004**.
- [62] Akahoshi, M., Nakashima, H., Sadanaga, A., Miyake, K., Obara, K., Tamari, M., Hirota, T., Matsuda, A., Shirakawa, T., Promoter polymorphisms in the IRF3 gene confer protection against systemic lupus erythematosus, *Lupus*, 17, 568-574, **2008**.
- [63] Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M., Golenbock, D.T., LPS-TLR4 Signaling to IRF-3/7 and NFκβ Involves the Toll Adapters TRAM and TRIF, *The Journal of Experimental Medicine*, 198, 1043-1055, **2003**.
- [64] Zhang, Y.-G., Huang, J., Zhang, J., Li, X.-B., He, C., Xiao, Y.-L., Tian, C., Wan, H., Zhao, Y.-L., Tsewang, Y.-G., Fana, H., RANTES Gene Polymorphisms and Asthma Risk: A Meta-Analysis, *Archives of Medical Research*, 41, 50, **2010**.

EK 1. ETİK KURULU ONAYI



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

Tıp Fakültesi Dekanlığı 06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: selmak@hacettepe.edu.tr
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr

Sayı: B.30.2.HAC.0.20.05.04/

835

13 Temmuz 2011

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 30 HAZİRAN 2011 PERŞEMBE
Toplantı No : 2011/7
Proje No : TBK 11/16 (Değerlendirme Tarihi 26.05.2011)
Karar No : TBK 11/16-14

Üniversitemiz Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Reyhan Öner sorumlu araştırmacısı olduğu Prof. Dr. Ayfer Tuncer, Arş. Gör. Dr. İ. Çağatay Karaaslan ve Solmaz Mosayyebi ile birlikte çalışacakları TBK 11/16 kayıt numaralı ve **"IRF 3 Geninin Astım ve Astım Fenotipleri ile İlişkisinin Araştırılması"** başlıklı proje önerisi Komisyonumuzda değerlendirilmiş olup, uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Rüştü Onur (Başkan)
2. Prof. Dr. Murat Yurdakök (Üye) KATILMADI
3. Prof. Dr. İbrahim Haznedaroğlu (Üye)
4. Prof. Dr. Arzu Topeli İskit (Üye)
5. Prof. Dr. İnci Erdemli (Üye) KATILMADI
6. Prof. Dr. Haydar A. Demirel (Üye)
7. Prof. Dr. Zafer Çehreli (Üye)
8. Prof. Dr. Osman Abbasoğlu (Üye) KATILMADI
9. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Üye)
10. Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye)
11. Prof. Dr. Alev Türker (Üye) KATILMADI
12. Prof. Dr. Nilgün Sayınalp (Üye)
13. Prof. Dr. S. Mehmet Mercanlıgil (Üye)
14. Doç. Dr. Mutlu Hayran (Üye) KATILMADI
15. Av. Meltem Onurlu (Üye)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Solmaz MOSAYYEBİ
Doğum Yeri : OROUMIEH (İRAN)
Medeni Hali : Bekar
E-posta : solmaz_mosayyeb@yahoo.com
Adresi : H.Ü. Beytepe Kampüsü Öğrenci Evleri Asistant 2 No: 307
ANKARA

Eğitim

Lise : Somayeh Lisesi
Lisans : Shahid Beheshti Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Azad (Bilim ve Araştırma) Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji Bölümü Moleküler ve hücre Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce-Advanced (ileri), Türkçe (ileri)

İş Deneyimi

2005-2007 Talegani hastanesi DNA Banking Bölümü

Deneyim Alanları

Moleküler genetik, Biyoteknoloji

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: TBK 11/16). Proje Bütçesi: 9000 TL'dir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

(-)

Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Solmaz Mosayyebi, Çağatay Karaaslan, Ayfer Tuncer, Cansın Sackesen, Ömer Kalaycı, Reyhan Öner. IRF3 Genindeki Polimorfizmlerin Astımlı ve Sağlıklı Kişilerde DNA Dizi Analiz Yöntemiyle Araştırılması. XIX. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi